

EAKV

09/673198

PCT/JP99/01987

日本特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

1404.99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 2月15日

REC'D 14 JUN 1999

WIPO PCT

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第035739号

出願人
Applicant(s):

協和醸酵工業株式会社

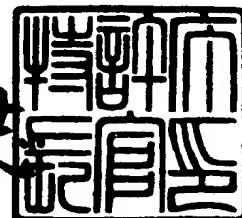
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 5月28日

特許長官
Commissioner,
Patent Office

佐山 建志



出証番号 出証特平11-3033389

301858\60

特平11-035739

【書類名】 特許願

【整理番号】 H11-0091N2

【提出日】 平成11年 2月15日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市麻生区王禅寺2625

【氏名】 三宅 浩一郎

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市成瀬2丁目12-1

【氏名】 橋本 信一

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区市ヶ尾町5-1-5

【氏名】 本山 裕章

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市中町3-9-13

【氏名】 尾崎 明夫

【発明者】

【住所又は居所】 東京都八王子市上野町100-5

【氏名】 瀬戸 治男

【発明者】

【住所又は居所】 東京都世田谷区代沢2-11-5

【氏名】 葛山 智久

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区西片1-9-5

【氏名】 高橋 俊二

【特許出願人】

【識別番号】 000001029

【氏名又は名称】 協和醸酵工業株式会社

【代表者】 平田 正

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成10年特許願第103101号

【出願日】 平成10年 4月14日

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成10年特許願第221910号

【出願日】 平成10年 8月 5日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008187

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 図面 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 微生物によるイソプレノイド化合物の製造方法および抗菌または除草活性化合物の探索方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)および(f)から選ばれるDNAを1つ以上含むDNAをベクターに組み込み、得られた組換え体DNAを原核生物由来の宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培地に培養し、培養物中にイソプレノイド化合物を生成蓄積させ、該培養物からイソプレノイド化合物を採取することを特徴とする、イソプレノイド化合物の製造法。

(a) ピルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸から1-デオキシ-D-キシルロース5-リン酸を生成する反応を触媒する活性を有する蛋白質をコードするDNA

(b) ファルネシリピロリン酸合成酵素をコードするDNA

(c) 配列番号3記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつイソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質をコードするDNA

(d) 配列番号4記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつイソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質をコードするDNA

(e) 1-デオキシ-D-キシルロース5-リン酸から2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸を生じる反応を触媒する活性を有する蛋白質をコードするDNA

(f) (a)、(b)、(c)、(d)および(e)から選ばれるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ選ばれたDNAにコードされた蛋白質が有する活性と実質的に同一の活性を有している蛋白質をコードするDNA

【請求項2】 ピルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸から1-デオキ

シ-D-キシリロース5-リン酸を生成する反応を触媒する蛋白質をコードするDNAが、配列番号1、26および28いずれかに記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつピルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸から1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸を生成する反応を触媒する活性を有する蛋白質をコードするDNAである、請求項1記載の製造法。

【請求項3】 DNAが、配列番号6、27および29いずれかに記載の塩基配列を有するDNAである、請求項1または2記載の製造法。

【請求項4】 ファルネシルピロリン酸合成酵素をコードするDNAが、配列番号2記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつファルネシルピロリン酸合成酵素活性を有する蛋白質をコードするDNAである、請求項1記載の製造法。

【請求項5】 DNAが、配列番号7記載の塩基配列を有するDNAである、請求項1または4記載の製造法。

【請求項6】 1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸から2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸を生じる反応を触媒する活性を有する蛋白質をコードするDNAが、配列番号5または30に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつピルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸から1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸を生成する反応を触媒する活性を有する蛋白質をコードするDNAである、請求項1記載の製造法。

【請求項7】 DNAが、配列番号10または31に記載の塩基配列を有するDNAである、請求項1または6記載の製造法。

【請求項8】 DNAが、配列番号8または9記載の塩基配列から選ばれる塩基配列を有するDNAである、請求項1記載の製造法。

【請求項9】 イソプレノイド化合物が、ユビキノン、ビタミンK2および

カロテノイドから選ばれるイソプレノイド化合物である、請求項1記載の製造方法。

【請求項10】以下の(a)、(b)および(c)から選ばれるイソプレノイド化合物の生合成功率を向上させることのできる活性を有する蛋白質。

(a)配列番号3記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質

(b)配列番号4記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質

(c)配列番号5記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質

【請求項11】請求項10記載の蛋白質をコードするDNAをベクターに組み込み、得られた組換え体DNAを宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培地に培養し、培養物中に該蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする、イソプレノイド化合物の生合成功率を向上させることのできる活性を有する蛋白質の製造法。

【請求項12】形質転換体が、Escherichia属に属する微生物、Rhodobacter属に属する微生物またはErwinia属に属する微生物である、請求項1または11記載の製造法。

【請求項13】以下の(a)～(g)いずれかに記載の、イソプレノイド化合物の生合成功率を向上させることのできる活性を有する蛋白質をコードするDNA。

(a)配列番号3記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA

(b)配列番号4記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA

(c)配列番号5記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA

(d)配列番号8記載の塩基配列を有するDNA

(e)配列番号9記載の塩基配列を有するDNA

(f) 配列番号10記載の塩基配列を有するDNA
 (g) (a)～(f)いずれかに記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA

【請求項14】ピルビン酸とグリセルアルデヒド3リン酸より1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸を合成した後、2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸の合成を経由しイソペンテニルピロリン酸を合成するための非メバロン酸経路上に存在する酵素から選ばれる酵素の有する活性を有している蛋白質の反応を阻害する物質を探索することを特徴とする抗菌活性を有する物質の探索法。

【請求項15】ピルビン酸とグリセルアルデヒド3リン酸より1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸を合成した後、2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸の合成を経由しイソペンテニルピロリン酸を合成するための非メバロン酸経路上に存在する酵素から選ばれる酵素の有する活性を有している蛋白質の反応を阻害する物質を探索することを特徴とする除草活性を有する物質の探索法。

【請求項16】蛋白質が、以下の(a)または(b)の蛋白質であることを特徴とする、請求項14または15記載の探索方法。

(a) ピルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸から1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸を生成する反応を触媒する活性を有する蛋白質

(b) 1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸から2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸を生じる反応を触媒する活性を有する蛋白質

【請求項17】ピルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸から1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸を生成する反応を触媒する蛋白質が、配列番号1記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が消失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつピルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸から1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸を生成する反応を触媒する活性を有する蛋白質である、請求項16記載の探索法。

【請求項18】1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸から2-C-

メチル-D-エリスリトール4-リン酸を生じる反応を触媒する活性を有する蛋白質が、配列番号5記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつピルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸から1-デオキシーD-キシリロース5-リン酸を生成する反応を触媒する活性を有する蛋白質である、請求項16記載の探索法。

【請求項19】 請求項14記載の探索法により取得される抗菌活性を有する物質。

【請求項20】 請求項15記載の探索法により取得される除草活性を有する物質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、原核生物由来の形質転換体を用いたイソプレノイド化合物の製造法、ならびに非メバロン酸経路に係わる抗菌または除草活性物質の探索方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

イソプレノイドとは、炭素数5のイソプレン単位を基本骨格に持つ化合物の総称で、イソペンテニルピロリン酸（IPP）の重合によって生合成される。自然界には多種多様なイソプレノイド化合物が存在しており、人類にとって有用なものも多い。

【0003】

例えば、ユビキノンは電子伝達系の必須成分として、生体内で重要な機能を果たしており、心疾患に効果のある医薬品として使用されているほか、欧米では健康食品としての需要が増大している。

【0004】

ビタミンKは血液凝固系に関与する重要なビタミンであり、止血剤として利用されているほか、最近骨代謝への関与が示唆され、骨粗鬆症治療への応用が期待

されており、フィロキノンとメナキノンは医薬品として許可されている。

また、ユビキノンやビタミンK類には貝類の付着阻害作用があり、貝類付着防止塗料への応用が期待される。

【0005】

さらに、カロテノイドと呼ばれる炭素数40のイソプレン骨格を基本とする化合物は抗酸化作用があり、 β -カロチン、アスタキサンチン、クリプトキサンチンなど、がん予防や免疫賦活活性を有するものとして期待されているものもある。

【0006】

このように、イソプレノイド化合物には多くの有用物質が含まれており、これらの安価な製造法が確立されれば、社会的にも医学的にも多大な恩恵があると思われる。

【0007】

発酵法によるイソプレノイド化合物の生産は以前から検討されており、培養条件の検討や変異処理による菌株育種、さらに遺伝子工学的手法による生産量の向上への試みもなされている。しかし、その効果は個々の化合物種に限定されており、イソプレノイド化合物全般に効果のある方法は知られていない。

【0008】

イソプレノイド化合物の基本骨格単位であるイソペンテニルピロリン酸（IPP）は、動物や酵母などの真核生物ではアセチルCoAからメバロン酸を経由して生合成される（メバロン酸経路）ことが証明されている。

【0009】

メバロン酸経路では3-ヒドロキシ-3-メチルグルタルCoA（HMG-CoA）リダクターゼが律速と考えられており [Mol. Biol. Cell, 5, 655(1994)]、酵母において、HMG-CoAリダクターゼを高発現化させカロテノイドの生産性を上げる試みがなされている [三沢ら カロテノイド研究談話会講演要旨集(1997)]。

【0010】

原核生物ではメバロン酸経路の存在を証明した知見はなく、別の経路、即ち、

ピルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸が縮合して生じる1-デオキシ-D-キシリース5-リン酸を経由してIPPが生合成されるという非メバロン酸経路が多くの原核生物において発見されており [Biochem. J., 295, 517 (1993)]、¹³Cラベル化基質を使った実験から1-デオキシ-D-キシリース5-リン酸は2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸を経由してIPPへと転換されることが示唆されている [Tetrahedron Lett. 38, 4769(1997)]。

【0011】

大腸菌において、ピルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸を縮合させ1-デオキシ-D-キシリース5-リン酸を生合成させる酵素1-デオキシ-D-キシリース5-リン酸合成酵素(DXS)をコードする遺伝子が同定されている [Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 94, 12857 (1997)]。該遺伝子は、ファルネシルピロリン酸合成酵素をコードするispAを含む4つのORFからなるオペロンに含まれている。

【0012】

更に、大腸菌においては、1-デオキシ-D-キシリース5-リン酸を2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸に変換する活性が存在することが知られている [Tetrahedron Lett. 39, 4509(1998)]。

【0013】

該オペロンに含まれるこれら遺伝子を操作して、イソプレノイド化合物の生産性を向上させることに関する記載も示唆も現時点ではない。

原核生物における非メバロン酸経路に関する知見は徐々に蓄積されつつあるが、関与する酵素やそれをコードする遺伝子の多くは未だ不明である。

【0014】

光合成細菌において、コリスマートを4-ヒドロキシベンゾエートへ転換する酵素ubcの遺伝子(ubc遺伝子)およびp-ヒドロキシベンゾエートトランスフェラーゼの遺伝子(ubcA)を導入することにより、ユビキノン-10を効率的に生産する方法が知られている(特開平8-107789)が、非メバロン酸経路の酵素遺伝子を操作することによってイソプレノイド化合物の生産性を向上させた例は皆無である。

【0015】

更に、非メバロン酸経路上の反応を、変異または薬剤処理等により阻害することにより、原核生物がいかなる影響を受けるかに関する知見はない。

【0016】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、心疾患、骨粗鬆症、止血、がん予防、免疫賦活等を目的とした医薬品、健康食品および貝類付着防止塗料等に有用なイソプレノイド化合物の生合成に関するDNAを1つ以上含むDNAをベクターに組み込み、得られた組換え体DNAを原核生物由来の宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培地に培養し、培養物中にイソプレノイド化合物を生成蓄積させ、該培養物からイソプレノイド化合物を採取することを特徴とする、イソプレノイド化合物の製造法、イソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質をコードするDNAを1つ以上含むDNAをベクターに組み込み、得られた組換え体DNAを宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培地に培養し、培養物中に該蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする、該蛋白質の製造法、該蛋白質および該蛋白質をコードするDNAを提供することにある。さらに、本発明の課題は、非メバロン酸経路上の酵素反応を阻害する物質を探索することを特徴とする、抗菌および除草活性物質の探索方法を提供することにある。

【0017】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、原核生物によるイソプレノイド生産性を向上させることのできるDNAを検索し、得られたDNAを原核生物に導入することにより、イソプレノイド生産性を向上させることのできることを見出し本発明を完成するに至った。

【0018】

即ち、本願の第1の発明は、以下の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)および(f)から選ばれるDNAを1つ以上含むDNAをベクターに組み込み、得られた組換え体DNAを原核生物由来の宿主細胞に導入し、得られた形質転換

体を培地に培養し、培養物中にイソプレノイド化合物を生成蓄積させ、該培養物からイソプレノイド化合物を採取することを特徴とする、イソプレノイド化合物の製造法である。

【0019】

(a) はピルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸から1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸を生成する反応を触媒する蛋白質をコードするDNA、

(b) はファルネシルピロリン酸合成酵素をコードするDNA、

(c) は配列番号3記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつイソプレノイド化合物の生合成功率を向上させることのできる活性を有する蛋白質をコードするDNA、

(d) は配列番号4記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつイソプレノイド化合物の生合成功率を向上させることのできる活性を有する蛋白質をコードするDNA、

(e) は1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸から2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸を生じる反応を触媒する活性を有する蛋白質をコードするDNA、

(f) は(a)、(b)、(c)、(d)および(e)から選ばれるDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ選ばれたDNAにコードされた蛋白質が有する活性と実質的に同一の活性を有している蛋白質をコードするDNAである。

【0020】

本明細書中の、アミノ酸の欠失、置換若しくは付加は、出願前周知技術である部位特異的変異誘発法により実施することができ、また、1若しくは数個のアミノ酸とは、部位特異的変異誘発法により欠失、置換若しくは付加できる程度の数のアミノ酸を意味する。

【0021】

かかる1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質は、モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリ・マニュ

アル(Molecular Cloning, A laboratory manual)、第二版〔サンブルック(Sambrook)、フリッチ(Fritsch)、マニアチス(Maniatis)編集、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス(Cold Spring Harbor Laboratory Press)、1989年刊(以下、モレキュラー・クローニング 第二版と略す)〕、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci USA, 82, 488 (1985)等に記載の方法に準じて調製することができる。

【0022】

上記において、ピルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸から1-デオキシ-D-キシリース5-リン酸を生成する反応を触媒する蛋白質をコードするDNAとして、例えば、配列番号1、26または28に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、あるいはこれら蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつピルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸から1-デオキシ-D-キシリース5-リン酸を生成する反応を触媒する活性を有する蛋白質をコードするDNA等をあげることができる。

【0023】

具体的な例として、配列番号6記載の塩基配列を有するDNA、配列番号27または29に記載の塩基配列を有するDNA等をあげることができる。

ファルネシリピロリン酸合成酵素をコードするDNAとして、例えば、配列番号2記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつファルネシリピロリン酸合成酵素活性を有する蛋白質をコードするDNAをあげることができる。具体的な例として、配列番号7記載の塩基配列を有するDNA等をあげることができる。

【0024】

配列番号3記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNAの具体的な

例として、配列番号8記載の塩基配列を有するDNA等をあげることができる。

【0025】

配列番号4記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNAの具体的な例として、配列番号9記載の塩基配列を有するDNA等をあげることができる。

1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸から2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸を生じる反応を触媒する活性を有する蛋白質をコードするDNAとして、例えば、配列番号5または30に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が消失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸から2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸を生じる反応を触媒する活性を有する蛋白質をコードするDNA等をあげることができる。

【0026】

該DNAの具体的な例として、配列番号10または31に記載の塩基配列を有するDNA等をあげることができる。

上記の「ストリングエントな条件下でハイブリダイズするDNA」とは、上記のDNAまたは該DNAの断片をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブラークハイブリダイゼーション法、あるいはサザンプロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブラーク由来のDNAまたは該DNAの断片を固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0MのNaCl存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1~2倍程度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM 塩化ナトリウム、15mM クエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。

【0027】

ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング 第二版等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとして、具体的には配列番号1、2、3、4および5から選ばれる塩基配列と少なくとも

70%以上の相同性を有するDNA、好ましくは90%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

【0028】

イソプレノイド化合物として、例えば、ユビキノン、ビタミンK2、カロテノイド等をあげることができる。

本願の第2の発明は、以下の(a)、(b)および(c)から選ばれるイソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質である。

【0029】

(a)は配列番号3記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質、

(b)は配列番号4記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質、

(c)は配列番号5記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる蛋白質である。

【0030】

本願の第3の発明は、上記の第2の発明に記載の蛋白質をコードするDNAをベクターに組み込み、得られた組換え体DNAを宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培地に培養し、培養物中に該蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする、イソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質の製造法である。

【0031】

上記において、形質転換体として、Escherichia属に属する微生物、Rhodobacter属に属する微生物またはErwinia属に属する微生物をあげることができる。

【0032】

本願の第4の発明は、以下の(a)、(b)、(c)および(d)から選ばれ

るイソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質をコードするDNAである。

- (a) は配列番号3記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、
- (b) は配列番号4記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、
- (c) は配列番号5記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、
- (d) は配列番号8記載の塩基配列を有するDNA、
- (e) は配列番号9記載の塩基配列を有するDNA、
- (f) は配列番号10記載の塩基配列を有するDNA、
- (g) は(a)～(f)いずれかに記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAである。

【0033】

本願の第5の発明は、ピルビン酸とグリセルアルデヒド3リン酸より1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸を生合成した後、2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸の生合成を経由しイソペンテニルピロリン酸を生合成するための非メバロン酸経路上に存在する酵素から選ばれる酵素の有する活性を有している蛋白質の反応を阻害する物質を探索することを特徴とする抗菌活性を有する物質の探索法である。

【0034】

本願の第6の発明は、ピルビン酸とグリセルアルデヒド3リン酸より1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸を生合成した後、2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸の生合成を経由しイソペンテニルピロリン酸を生合成するための非メバロン酸経路上に存在する酵素から選ばれる酵素の有する活性を有している蛋白質の反応を阻害する物質を探索することを特徴とする除草活性を有する物質の探索法である。

【0035】

上記発明5および6において、蛋白質として、以下の(a)または(b)の蛋白質をあげることができる。

- (a) はピルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸から1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸を生成する反応を触媒する活性を有する蛋白質、

(b) は 1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸から 2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸を生じる反応を触媒する活性を有する蛋白質である。

【0036】

上記において、ピルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸から 1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸を生成する反応を触媒する蛋白質として、例えば、配列番号1記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつピルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸から 1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸を生成する反応を触媒する活性を有する蛋白質をあげることができる。

【0037】

1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸から 2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸を生じる反応を触媒する活性を有する蛋白質として、例えば、配列番号5記載のアミノ酸配列を有する蛋白質、または該蛋白質の有するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつピルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸から 1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸を生成する反応を触媒する活性を有する蛋白質をあげることができる。

【0038】

本発明の第7の発明は、上記第5の発明の探索法により取得される抗菌活性を有する物質である。ただし、該探索法により取得される公知の物質は本発明に入らない。

【0039】

本発明者らは、1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸レダクトイソメラーゼ反応の産物である2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸やこの酵素反応で想定される反応中間体とフォスマミドマイシン [3-(N-formyl-N-hydroxyamino)propylphosphonic acid] との構造的類似性に着目し、フォスマミドマイシンが1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸レダクトイソメラーゼ阻害活性を

有し、かつ抗菌活性をも有するとの推測の基に、後述の実施例10に示した上記第5の発明の探索法の実験を行い、フォスマミドマイシンが、該阻害活性を有し、かつ抗菌活性を有する物質であることを見いだすと共に、上記第5の発明の探索法の妥当性を証明したが、公知であるフォスマミドマイシンは本発明から除かれる。

【0040】

本発明の第8の発明は、上記第6の発明の探索法により取得される除草活性を有する物質である。上記同様、該探索法により取得される公知の物質は本発明に入らない。

以下、本発明を詳細に説明する。

【0041】

【発明の実施の形態】

I. イソプレノイド化合物の生合成に関与する蛋白質をコードするDNAの取得

(1) DXSをコードするDNA(DXS遺伝子)の塩基配列を利用した、イソプレノイド化合物の生合成に関与する蛋白質をコードするDNAの取得

既に決定されている、大腸菌の染色体およびDXS遺伝子の塩基配列情報 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 94, 12857 (1997)] を利用し、大腸菌よりDXS遺伝子を含む、あるいはDXS遺伝子近隣の遺伝子のDNA領域をPCR法 [Science, 230, 1350(1985)] によりクローニングし、取得することができる。

【0042】

DXS遺伝子を含む塩基配列情報として、例えば、配列番号11に記載の塩基配列をあげることができる。

DXS遺伝子を含むDNA領域の取得法としては、具体的には以下の方法をあげることができる。

【0043】

大腸菌、例えばE. coli XL1-Blue株（東洋紡より購入可能）を大腸菌に適した培地、例えばLB液体培地〔バクトリプトン(ディフコ社製) 10g、酵母エキス(ディフコ社製) 5g、NaCl 5gを水1リットルに含みpH7.2に

調整した培地] を用い常法に従って培養する。

【0044】

培養後、培養物より遠心分離により菌体を取得する。

取得した菌体より公知の方法(例えば、モレキュラー・クローニング 第二版)に従い染色体DNAを単離する。

【0045】

配列番号11に記載された塩基配列情報を利用し、DXS遺伝子を含む、あるいはDXS遺伝子近隣の遺伝子のDNA領域に対応する塩基配列を含有するセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーをDNA合成機を用いて合成する。

【0046】

PCR法により増幅後、該増幅DNA断片をプラスミドに導入可能なようにセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーの5'末端には適切制限酵素サイト、例えばBamH I、EcoR I等の制限酵素サイトを付加させが好ましい。

【0047】

該センスプライマー、アンチセンスプライマーの組合せとしては、例えば、配列番号12および13、配列番号14および15、配列番号12および16、配列番号17および18、配列番号19および13、配列番号22および23の組合せの塩基配列を有するDNA等をあげることができる。

【0048】

染色体DNAを鑄型として、これらプライマー、TaKaRa LA-PCRTM Kit Ver.2(宝酒造社製)またはExpandTM High-Fidelity PCR System(ベーリンガー・マンハイム社製)等を用い、DNA Thermal Cycler(パーキンエルマージャパン社製)でPCRを行う。

【0049】

PCRの条件として、上記プライマーが2kb以下のDNA断片の場合には94℃で30秒間、55℃で30秒～1分間、72℃で2分間からなる反応工程を1サイクルとして、2kbを超えるDNA断片の場合には98℃で20秒間、68℃で3分間からなる反応工程を1サイクルとして、30サイクル行った後、

72℃で7分間反応させる条件をあげることができる。

【0050】

該增幅されたDNA断片を、大腸菌で增幅可能な適切なベクターを上記プライマーで付与した制限酵素サイトと同じサイトで切断後、アガロース電気泳動、シユークロース密度勾配超遠心分離等の手法によりDNA断片を分画・回収する。

【0051】

該回収DNA断片を用い、常法、例えば、モレキュラー・クローニング 第二版、*Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38*, John Wiley & Sons (1987-1997)、*DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach*, Second Edition, Oxford University Press (1995)等に記載された方法、あるいは市販のキット、例えば*SuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning* (ライフ・テクノロジーズ社製) や*ZAP-cDNA Synthesis Kit* [ストラタジーン (Staratagene)社製] を用いクローニングベクターを作製し、作製した該クローニングベクターを用い、大腸菌、例えばE. coli DH5 α 株 (東洋紡より購入可能) を形質転換する。

【0052】

該大腸菌を形質転換するためのクローニングベクターとしては、大腸菌K12株中で自律複製できるものであれば、ファージベクター、プラスミドベクター等いずれでも使用できる、大腸菌の発現用ベクターをクローニングベクターとして用いてもよい。具体的には、ZAP Express [ストラタジーン社製、*Strategies*, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK(+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、Lambda ZAP II (ストラタジーン社製)、 λ gt10、 λ gt11 [DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)]、 λ TriplEx (クローンテック社製)、 λ ExCell (ファルマシア社製)、pT7T318U (ファルマシア社製)、pcD2 [H. Okayama and P. Berg; Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)]、pMW218 (和光純薬社製)、pUC118 (宝酒造社製)、pEG400 [J. Bac., 172, 2392 (1990)]、pQE-30 (QIAGEN社製) 等をあげることができる。

【0053】

得られた形質転換株より、目的とするDNAを含有したプラスミドを常法、例

えば、モレキュラー・クローニング 第二版、*Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997)*、*DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University Press (1995)*等に記載された方法により取得することができる。

【0054】

該方法により、ピルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸から1-デオキシ-D-キシリース5-リン酸を生成する反応を触媒する蛋白質をコードするDNA、ファルネシルピロリン酸合成酵素をコードするDNA、配列番号3記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、配列番号4記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA等を有するプラスミドおよびこれらDNAを1つ以上含むプラスミドを取得することができる。

【0055】

該プラスミドとして、例えば、上記DNAを全て含むプラスミドpADO-1、配列番号6記載の塩基配列を有するDNAを含むプラスミドpDXS-1あるいはpQEDXS-1、配列番号7記載の塩基配列を有するDNAを含むプラスミドpISP-1、配列番号8記載の塩基配列を有するDNAを含むプラスミドpXSE-1、配列番号9記載の塩基配列を有するDNAを含むプラスミドpTFE-1等をあげることができる。

【0056】

これらプラスミドに挿入された大腸菌由来のDNA断片の塩基配列を利用し、他の原核生物、例えば、Rhodobacter属に属する微生物等より、該DNAのホモログを上記と同様の方法により取得することができる。

【0057】

(2) 大腸菌のメチルエリスリトール要求性変異株を相補することのできる活性を有する蛋白質をコードするDNA(メチルエリスリトール要求性相補遺伝子)の取得

① 大腸菌メチルエリスリトール要求性変異株の取得

大腸菌、例えばE. coli W3110株(ATCC14948)を、常法に従って培養する。

【0058】

培養後、得られた培養液より遠心分離により菌体を取得する。

該菌体を、適切な緩衝剤、例えば、0.05M トリス-マレイン酸緩衝液 (pH 6.0) 等で洗浄後、菌体濃度が $10^4 \sim 10^{10}$ 細胞/mL になるように同緩衝液に懸濁する。

【0059】

該懸濁液を用いて常法により変異処理を行う。常法として、例えば、該懸濁液にNTGを終濃度が 600 mg/L になるように加え、室温で 20 分間保持して変異処理する方法をあげることができる。

【0060】

該変異処理懸濁液を最少寒天培地に 0.05 ~ 0.5% メチルエリスリトールを添加した培地で培養する。

最少寒天培地として、例えば、M9 培地（モレキュラー・クローニング 第二版）に寒天を添加した培地等をあげることができる。

【0061】

メチルエリスリトールは、*Tetrahedron Letters*, 38, 35, 6184 (1997) に記載の方法に準じて化学合成したもの用いることができる。

培養後、生育し形成されたコロニーを、最少寒天培地とメチルエリスリトールを 0.05 ~ 0.5% 含む最少寒天培地にレプリカし、メチルエリスリトール要求性を示すもの、すなわち、メチルエリスリトールを含む最少寒天培地では生育できるが、最少寒天培地では生育できない株を目的の変異株として選択する。

【0062】

該操作により取得されたメチルエリスリトール要求性変異株としてME7 株をあげることができる。

② メチルエリスリトール要求性相補遺伝子の取得

大腸菌、例えば、*E. coli* W3110 株 (ATCC14948) を培養培地、例えば、LB 液体培地に植菌し、常法に従って対数増殖期まで培養する。

【0063】

培養後、得られた培養液を遠心分離して菌体を回収する。

得られた菌体より、常法（例えば、モレキュラー・クローニング 第二版）に記

載の方法)に従い染色体DNAを単離・精製する。上記(1)に記載の方法で取得される染色体DNAを単離・精製された染色体DNAとして用いることもできる。

【0064】

該染色体DNAの適当量を適切な制限酵素、例えば、Sau3A Iで部分消化し、得られた消化DNA断片を、常法、例えば、シーケロース密度勾配超遠心分離(26,000 rpm, 20℃, 20 hr)により、サイズ分画する。

【0065】

該分画により取得される大きさが4~6 kbのDNA断片を、適切な制限酵素で消化したベクター、例えば、pMW118(ニッポンジーン社製)にライゲーションすることにより染色体ゲノムライブラリーを作製する。

作製した染色体ライブラリーを用い、上記①で分離されたメチルエリスリトール要求性変異株、例えば、ME7株を常法(例えば、モレキュラー・クローニング 第二版に記載の方法)に従い形質転換する。

【0066】

該形質転換体を、ベクターの有する薬剤耐性遺伝子に対応する薬剤を添加した最少寒天培地、例えば、アンピシリン100 μg/1入れたM9寒天培地に塗布し、37℃で一晩培養する。

該方法により、メチルエリスリトール要求性の回復された形質転換体を選択することができる。

【0067】

得られた該形質転換体より、常法によりプラスミドを抽出する。該メチルエリスリトール要求性を回復させることのできるプラスミドとして、例えばpMEW73、pQEDXRをあげることができる。

該プラスミド中に導入されたDNAの塩基配列を決定する。

【0068】

該方法により決定された塩基配列として、配列番号10に示されるyaem遺伝子の塩基配列を含む配列等をあげることができる。得られた該yaem遺伝子の塩基配列情報を利用して他の原核生物あるいは植物から該yaem遺伝子のホモログを上記

と同様の方法により取得することができる。

【0069】

II. イソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質の製造

上記のようにして得られたDNAを宿主細胞中で発現させるためには、まず、目的とする該DNA断片を、制限酵素類あるいはDNA分解酵素類で、該遺伝子を含む適當な長さのDNA断片とした後に、発現ベクター中プロモーターの下流に挿入し、次いで上記DNAを挿入した発現ベクターを、発現ベクターに適合した宿主細胞中に導入する。

【0070】

宿主細胞としては、目的とする遺伝子を発現できるものは全て用いることができる。例えば、エッシェリヒア属、セラチア属、コリネバクテリウム属、ブレビバクテリウム属、シュードモナス属、バチルス属、ミクロバクテリウム属等に属する細菌、クルイベロミセス属、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、トリコスボロン属、シワニオミセス属等に属する酵母や動物細胞、昆虫細胞等をあげることができる。

【0071】

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能ないしは染色体中の組込みが可能で、上記目的とするDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

【0072】

細菌等を宿主細胞として用いる場合は、上記DNAを発現させるための発現ベクターは該細菌中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、上記DNAおよび転写終結配列より構成された組換えベクターであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【0073】

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（いずれもベーリンガーマンハイム社より市販）、pKK233-2（Pharmacia社製）、pSE280（Invitrogen社製）、pGEMEX-1（Promega社製）、pQE-8（QIAGEN社製）、pQE-30（QIAGEN社

製)、pKYP10(特開昭58-110600)、pKYP200[Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984)]、pLSA1[Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescriptII SK+、pBluescriptII SK(-)(Stratagene社製)、pTrS30(FERM BP-5407)、pTrS32(FERM BP-5408)、pGEX(Pharmacia社製)、pET-3(Novagen社製)、pTerm2(US4686191、US4939094、US5160735)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pUC18[gene, 33, 103 (1985)]、pUC19[Gene, 33, 103 (1985)]、pSTV28(宝酒造社製)、pSTV29(宝酒造社製)、pUC118(宝酒造社製)、pPA1(特開昭63-233798)、pEG400[J. Bacteriol., 172, 2392(1990)]、pQE-30(QIAGEN社製)等を例示することができる。

【0074】

プロモーターとしては、宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター(Ptrp)、lacプロモーター(Plac)、P_Lプロモーター、P_Rプロモーター、P_{SE}プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SP01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーター等をあげることができる。またPtrpを2つ直列させたプロモーター(Ptrpx2)、tacプロモーター、letIプロモーター、lacT7プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

【0075】

リボソーム結合配列としては、宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよいが、シャイン-ダルガノ(Shine-Dalgarno)配列と開始コドンとの間を適当な距離(例えば6~18塩基)に調節したプラスミッドを用いることが好ましい。

【0076】

目的とするDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、好適には構造遺伝子直下に転写終結配列を配置することが望ましい。

宿主細胞としては、Escherichia属、Crynebacterium属、Brevibacterium属、Bacillus属、Microbacterium属、Serratia属、Pseudomonas属、Agrobacterium属、Alicyclobacillus属、Anabaena属、Anacystis属、Arthrobacter属、Azobacter

属、Chromatium属、Erwinia属、Methylobacterium属、Phormidium属、Rhodobacter属、Rhodopseudomonas属、Rhodospirillum属、Scenedesmus属、Streptomyces属、Synnecoccus属、Zymomonas属等に属する微生物をあげることができ、好ましくは、Escherichia属、Corynebacterium属、Brevibacterium属、Bacillus属、Pseudomonas属、Agrobacterium属、Alicyclobacillus属、Anabaena属、Anacystis属、Arthrobacter属、Azobacter属、Chromatium属、Erwinia属、Methylobacterium属、Phormidium属、Rhodobacter属、Rhodopseudomonas属、Rhodospirillum属、Scenedesmus属、Streptomyces属、Synnecoccus属、Zymomonas属に属する微生物等をあげることができる。

【0077】

該微生物の具体例として、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli DH5 α 、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Escherichia coli MP347、Escherichia coli NM522、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Brevibacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Brevibacterium flavum ATCC14067、Brevibacterium lactofermentum ATCC13869、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC14297、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Pseudomonas sp. D-0110、Agrobacterium radiobacter、Agrobacterium rhizogenes、Agrobacterium rubi、Anabaena cylindrica、Anabaena doliolum、Anabaena flos-aquae、Arthrobacter aurescens、Arthrobacter citreus、Arthrobacter globformis、Arthrobacter hydrocarbolutamicus、Arthrobacter mysorens、Arthrobacter nicotianae、Arthrobacter paraffineus、Arthrobacter protophormiae、Arthrobacter roseoparaffinus、Arthrobacter sulfureus、Arthrobacter ureafaciens、Chromatium buderii、Chromatium tepidum、Chromatium vinosum、Chromatium war-

mingii、Chromatium fluviale、Erwinia uredovora、Erwinia carotovora、Erwinia ananas、Erwinia herbicola、Erwinia punctata、Erwinia terreus、Methylobacterium rhodesianum、Methylobacterium extorquens、Phormidium sp. AT CC29409、Rhodobacter capsulatus、Rhodobactersphaerooides、Rhodopseudomonas blastica、Rhodopseudomonas marina、Rhodopseudomonas palustris、Rhodospirillum rubrum、Rhodospirillum salexigens、Rhodospirillum salinarum、Streptomyces ambofaciens、Streptomyces aureofaciens、Streptomyces aureus、Streptomyces fungicidicus、Streptomyces griseochromogenes、Streptomyces griseus、Streptomyces lividans、Streptomyces olivogriseus、Streptomyces rameus、Streptomyces tanashiensis、Streptomyces vinaceus、Zymomonas mobilis等をあげることができる。

【0078】

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)〕、プロトプラスト法(特開昭63-2483942)、またはGene, 17, 107 (1982)やMolecular & General Genetics, 168, 111 (1979)に記載の方法等をあげることができる。

【0079】

酵母を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEP13(ATCC37115)、YEP24(ATCC37051)、YCP50(ATCC37419)、pHS19、pHS15等を例示することができる。

【0080】

プロモーターとしては、酵母中で発現できるものであればいかなるものでもよく、例えば、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショック蛋白質プロモーター、MFα1プロモーター、CUP1プロモーター等のプロモーターをあげることができる。

【0081】

宿主細胞としては、サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae

)、シゾサッカロミセス・ポンベ (Schizosaccharomyces pombe)、クリュイベルミセス・ラクチス (Kluyveromyces lactis)、トリコスボロン・プルランス (Trichosporon pullulans)、シュワニオミセス・アルビウス (Schwanniomyces alluvius) 等をあげることができる。

【0082】

組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods. Enzyme, 1, 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163(1983)]、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)記載の方法等をあげることができる。

【0083】

動物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、p c DNA I、p c DM 8 (フナコシ社より市販)、p AGE 107 [特開平3-22979; Cytotechnology, 3, 133, (1990)]、p AS 3-3 (特開平2-227075)、p CDM 8 [Nature, 329, 840, (1987)]、p c DNA I/Amp (Invitrogen社製)、p REP 4 (Invitrogen社製)、p AGE 103 [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、p AGE 210等を例示することができる。

【0084】

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス(ヒトCMV)のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR α プロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

【0085】

宿主細胞としては、ナマルバ細胞、HBT5637 (特開昭63-299)、COS1細胞、COS7細胞、CHO細胞等をあげることができる。

動物細胞への組換えベクターの導入法としては、動物細胞にDNAを導入できるいかなる方法も用いることができ、例えば、エレクトロポーレーション法 [Cy

totechnology, 3, 133(1990)]、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法 [Proc.Natl.Acad.Sci.,USA, 84, 7413(1987)]、virology, 52, 456 (1973)に記載の方法等を用いることができる。形質転換体の取得および培養は、特開平2-227075号公報あるいは特開平2-257891号公報に記載されている方法に準じて行なうことができる。

【0086】

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばバキュロウイルス・イクスピレーション・ベクターズ・ア・ラボラトリー・マニュアル (Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー サップルメント1-3 8 (1987-1997)、Bio/Technology, 6, 47 (1988)等に記載された方法によって、蛋白質を発現することができる。

【0087】

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる。

【0088】

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII (ともにインビトロジェン社製) 等をあげることができる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盜蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラファ・カリフォルニカ・ヌクレア・ポリヘドロシス・ウイルス (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) 等を用いることができる。

【0089】

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞であるSf9、Sf21 [バキュロウイルス・エクスピレーション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル、ダブリュー・エイチ・フリーマン・アンド・カンパニー (W. H. Freeman and Company)、ニューヨーク (New York)、(1992)]、Trichoplusia ni の卵巣細胞であるHigh 5 (インビトロジェン社製) 等を用いることができる。

【0090】

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法（特開平2-227075）、リポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] 等をあげることができる。

【0091】

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、モレキュラー・クローニング第二版に記載されている方法等に準じて、分泌生産、融合蛋白質発現等を行うことができる。

【0092】

酵母、動物細胞または昆虫細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加された蛋白質を得ることができる。

上記D N Aを組み込んだ組換え体D N Aを保有する形質転換体を培地に培養し、培養物中にイソプレノイド化合物の生合成功率を向上させることのできる活性を有する蛋白質を生成蓄積させ、該培養物より該蛋白質を採取することにより、イソプレノイド化合物の生合成功率を向上させることのできる活性を有する蛋白質を製造することができる。

【0093】

本発明のイソプレノイド化合物の生合成功率を向上させることのできる活性を有する蛋白質製造用の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

【0094】

本発明の形質転換体が大腸菌等の原核生物、酵母菌等の真核生物である場合、これら微生物を培養する培地は、該微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれでもよい。

【0095】

炭素源としては、それぞれの微生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデン

ブン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類が用いられる。

【0096】

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、等の各種無機酸や有機酸のアンモニウム塩、その他含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチーリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等が用いられる。

【0097】

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が用いられる。

【0098】

培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養などの好気的条件下で行う。培養温度は15~40℃がよく、培養時間は、通常16時間~7日間である。培養中pHは、3.0~9.0に保持する。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

【0099】

また培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸(IAA)等を培地に添加してもよい。

【0100】

動物細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地 [The Journal of the American Medica

I Association, 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [Science, 122, 501 (1952)]、D MEM培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199培地 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1(1950)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。

【0101】

培養は、通常 pH 6~8、30~40°C、5% CO₂存在下等の条件下で1~7日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0102】

昆虫細胞を宿主細胞として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地 [Pharmingen社製]、SF-900 II SFM培地 (ギブコBRL社製)、ExCell400、ExCell405 [いずれもJRH Biosciences社製]、Grace's Insect Medium [Grace, T.C.C., Nature, 195, 788 (1962)] 等を用いることができる。

【0103】

培養は、通常 pH 6~7、25~30°C等の条件下で、1~5日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0104】

本発明の形質転換体の培養物から、本発明のイソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質を単離精製するには、通常の酵素の単離、精製法を用いればよい。

例えば、本発明の蛋白質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液にけん渦後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) -セファロース

、DIAION HPA-75(三菱化成社製)等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(ファルマシア社製)等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティーコロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

【0105】

また、該蛋白質が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該蛋白質を回収後、該蛋白質の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を、蛋白質変性剤を含まないあるいは蛋白質変性剤の濃度が蛋白質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該蛋白質を正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

【0106】

本発明の蛋白質あるいはその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該蛋白質あるいはその糖鎖付加体等の誘導体を回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

【0107】

このようにして取得される蛋白質として、例えば、配列番号1～5に示されるアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を有する蛋白質をあげることができる。

また、上記方法により発現させた蛋白質を、Fmoc法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc法(t-ブチルオキシカルボニル法)等の化学合成法によっても製造することができる。また、桑和貿易(米国Advanced chemTech社製)、パーキンエルマージャパン(米国Perkin-Elmer社製)、ファルマシアバイオテク(スウェーデンPharmacia Bi tech社製)、アロカ(米国Protein Technology Instrument社製)、クラボウ(米国Synthecell-Vega社製)、日本バーセプティブ・

リミテッド(米国PerSeptive社製)、島津製作所等のペプチド合成機を利用し合成することもできる。

【0108】

III. イソプレノイド化合物の製造

上記II. で取得された形質転換体を、上記II. の方法に準じて培養し、培養物中にイソプレノイド化合物を生成蓄積させ、該培養物からイソプレノイド化合物を採取することによりイソプレノイド化合物を製造することができる。

【0109】

該培養により、ユビキノン、ビタミンK2、カロテノイド等のイソプレノイド化合物を製造することができる。具体的な例として、例えば、Escherichia属に属する微生物を形質転換体としたユビキノン-8やメナキノン-8の製造、Rhodobacter属に属する微生物を形質転換体としたユビキノン-10の製造、Arthrobacter属に属する微生物を形質転換体としたビタミンK2の製造、Agrobacterium属に属する微生物を形質転換体としたアスタキサンチンの製造、Erwinia属に属する微生物を形質転換体としたリコペン、β-カロテン、ゼアキサンチンの製造等をあげることができる。

【0110】

培養終了後、培養液に適当な溶媒を加えてイソプレノイド化合物を抽出し、遠心分離などで沈殿物を除去した後、各種クロマトグラフィーを行うことによりイソプレノイド化合物を単離・精製することができる。

【0111】

IV. 非メバロン酸経路上の酵素活性を阻害する物質の探索

(1) 非メバロン酸経路上の酵素活性の測定

非メバロン酸経路上の酵素活性の測定は、通常の酵素の活性測定法に準じて行うことができる。

【0112】

即ち、活性測定の反応液に用いる緩衝液のPHは、目的とする酵素の活性を阻害しないPH範囲であればよく、最適PHを含む範囲のPHが好ましい。

例えば、1-デオキシ-D-キシリース5-リン酸レダクトイソメラーゼに

においては、pH 5~10、好ましくは6~9である。

【0113】

緩衝液としては、酵素活性を阻害せず、上記pHを達成できるものであればいずれの緩衝液も用いることができる。該緩衝液として、トリス塩酸緩衝液やリン酸緩衝液、硼酸緩衝液、HEPES緩衝液、MOPS緩衝液、炭酸水素緩衝液などを用いることができる。1-デオキシ-D-キシルロース5-リン酸レダクトイソメラーゼにおいては、例えば、トリス塩酸緩衝液が好適に用いられる。

【0114】

緩衝液の濃度は酵素活性に阻害を及ぼさない限りどのような濃度でも用いることができるが、好適には1mMから1Mである。

目的とする酵素に補酵素が必要な場合には、反応液に補酵素を添加する。例えば、1-デオキシ-D-キシルロース5-リン酸レダクトイソメラーゼにおいては、NADPH、NADHあるいはその他の電子供与体を用いることができ、好ましくはNADPHをあげることができる。

【0115】

添加する補酵素の濃度は、反応を阻害しない限りいずれの濃度でも用いることができるが、好適には0.01mM~100mM、より好ましくは0.1mM~10mMの濃度である。

【0116】

反応液には必要に応じて金属イオンを添加してもよい。金属イオンは、反応を阻害しない限りどのようなものでも添加することができるが、好適には Co^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} などがあげられる。

金属塩として金属イオンを添加することができ、例えば、塩化物や硫酸塩、炭酸塩、リン酸塩などとして添加することができる。

【0117】

添加する金属イオンの濃度は、反応を阻害しない限りどのような濃度でも添加できるが、好適には0mMから100mM、より好適には0.1mMから10mMである。

反応液には、目的とする酵素の基質を添加する。例えば、1-デオキシ-D-

キシリロース5-リン酸レダクトイソメラーゼにおいては、1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸を添加する。

【0118】

基質の濃度は反応に支障のない限りどのような濃度でも用いることができるが、好適には反応液中の濃度は0.01mM～0.2Mである。

反応に用いる酵素濃度に特に制限はないが、通常0.01mg/mlから100mg/mlの濃度範囲で反応を行う。

【0119】

用いる酵素は必ずしも单一にまで精製されている必要はなく、反応を妨害しない限り、他の雑蛋白質が混入した標品であってもよい。また、下記(2)の探索においては、該酵素活性を含む細胞抽出液あるいは該酵素活性を有する細胞も用いることができる。

【0120】

反応温度は、目的とする酵素の活性を阻害しない温度範囲であればよく、最適温度を含む範囲の温度が好ましい。即ち、反応温度は、10℃から60℃、より好ましくは30℃から40℃である。

【0121】

活性の検出は、反応に伴う基質の減少、あるいは反応生成物の増加を、基質あるいは反応生成物を測定できる方法を用いて行うことができる。

該方法として、例えば、必要に応じて高速液体クロマトグラフィー法(HPLC)等により目的物質を分離定量する方法をあげることができる。また反応の進行に伴ってNADHやNADPHが増減する場合には、反応液の340nmの吸光度を測定することで活性を直接測定することができる。例えば、1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸レダクトイソメラーゼにおいては、340nmの吸光の減少を分光光度計で測定することにより反応の進行に伴い減少するNADPHを定量し、活性を検出することができる。

【0122】

(2) 非メバロン酸経路上の酵素活性を阻害する物質の探索

非メバロン酸経路上の酵素活性を阻害する物質の探索は、上記(1)の酵素活

性測定系に被探索物質を加えて同様に反応させ、無添加時より基質の減少量を抑えるような物質あるいは反応産物の生成量を抑えるような物質を探索することで行うことができる。

【0123】

探索の方法としては、基質の減少量あるいは反応生産物の増加量等を経時的に追跡する方法、一定時間反応させた後の基質の減少量あるいは反応生産物の増加量等を測定する方法等をあげることができる。

【0124】

基質の減少量あるいは反応生産物の増加量等を経時的に追跡する方法においては、反応中15秒～20分程度の間隔で基質の減少量あるいは反応生産物の増加量を測定することが好ましく、1～3分間隔で測定することがより好ましい。

【0125】

一定時間反応させた後の基質の減少量あるいは反応生産物の増加量等を測定する方法においては、反応時間は、10分～1日が好ましく、より好ましくは30分～2時間である。

【0126】

非メバロン酸経路上の酵素活性を阻害する物質は、該非メバロン酸経路を有する微生物および植物の生育を阻害する。該物質が該微生物および植物の生育を阻害することは、本発明者らが始めて見出した。

非メバロン酸経路は微生物や植物に存在し、動物や人には存在しないことより、上記探索法により、人や動物に影響を及ぼさない、非メバロン酸経路上の酵素活性を阻害する物質を取得することができる。

【0127】

該物質は、有効な抗菌剤あるいは除草剤となり得る。

以下に本発明の実施例を示すが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。実施例で示した遺伝子組換え実験は、特に言及しない限りモレキュラー・クローニング 第二版に記載の方法（以下、常法と呼ぶ）を用いて行った。

【実施例】

【0128】

実施例1 イソプレノイド化合物の生合成に関する蛋白質をコードするDNAの取得

(1) 大腸菌DXS遺伝子の塩基配列を利用した、イソプレノイド化合物の生合成に関する蛋白質をコードするDNAの取得

E. coli XL1-Blue株（東洋紡より購入）を1白金耳、10mlのLB液体培地に植菌し、37℃で一晩培養した。

【0129】

培養後、得られた培養液より遠心分離により菌体を取得した。

該菌体より、常法に従い染色体DNAを単離・精製した。

配列番号12および13、配列番号14および15、配列番号12および16、配列番号17および18、配列番号19および13の塩基配列の組合せを有する5'末端にBamH IおよびEcoR I制限酵素切断部位をそれぞれ有するセンスプライマーおよびアンチセンスプライマー、配列番号22および23の塩基配列の組合せを有する5'末端にBamH I制限酵素切断部位をそれぞれ有するセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーをDNA合成機を用いて合成した。

【0130】

染色体DNAを錆型として、これらプライマーと、TaKaRa LA-PCRTM Kit Ver.2(宝酒造社製)、ExpandTM High-Fidelity PCR System(ベーリンガー・マンハイム社製)またはTaq DNA polymerase (Boehringer社製)を用い、DNA Thermal Cycler(パーキンエルマージャパン社製)でPCRを行った。

【0131】

PCRは、2kb以下のDNA断片は94℃で30秒間、55℃で30秒～1分間、72℃で2分間からなる反応工程を1サイクルとして、2kbを超えるDNA断片は98℃で20秒間、68℃で3分間からなる反応工程を1サイクルとして、30サイクル行った後、72℃で7分間反応させる条件で行った。

【0132】

PCRにより増幅されたDNA断片のうち、5'末端にBamH IおよびEcoR I制限酵素切断部位をそれぞれ有するセンスプライマーおよびアンチセンス

プライマーを用いて増幅されたDNA断片は制限酵素BamH IおよびEcoR Iで消化し、5'末端にBamH I制限酵素切断部位をそれぞれ有するセンスプライマーおよびアンチセンスプライマーを用いて増幅されたDNA断片は制限酵素BamH Iで消化した。

【0133】

消化後、これら制限酵素処理DNA断片をアガロースゲル電気泳動し、BamH I - EcoR I処理DNA断片およびBamH I処理DNA断片を取得した。

【0134】

lacプロモーターを有する広宿主ベクターpEG400 [J. Bac., 172, 2392 (1990)]を、制限酵素BamH IおよびEcoR Iで消化後、アガロースゲル電気泳動を行い、BamH I - EcoR I処理pEG400断片を取得した。

【0135】

pUC118(宝酒造社製)を制限酵素BamH Iで消化後、アガロースゲル電気泳動を行いBamH I処理pUC118断片を取得した。

上記で取得されたBamH I - EcoR I処理DNA断片各々についてBamH I - EcoR I処理pEG400断片と混合した後、エタノール沈殿を行い、得られたDNA沈殿物を5μlの蒸留水に溶解し、ライゲーション反応を行うことにより組換え体DNAを各々取得した。

【0136】

該組換え体DNAを用い、E. coli(東洋紡より購入)DH5α株を常法に従って形質転換後、該形質転換体をスペクチノマイシン100μg/mlを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩培養した。

【0137】

生育してきたスペクチノマイシン耐性の形質転換体のコロニー数個について、スペクチノマイシン100μg/mlを含むLB液体培地10mlで37℃16時間振盪培養した。

得られた培養液を遠心分離することにより菌体を取得した。

【0138】

該菌体より常法に従ってプラスミドを単離した。

該方法により単離したプラスミドを各種制限酵素で切断して構造を調べ、塩基配列を決定することにより、目的のDNA断片が挿入されているプラスミドであることを確認した。

【0139】

配列番号6記載の塩基配列を有するDNA、配列番号7記載の塩基配列を有するDNA、配列番号8記載の塩基配列を有するDNAおよび配列番号9記載の塩基配列を有するDNAを含むプラスミドをpADO-1、配列番号6記載の塩基配列を有するDNAを含むプラスミドをpDXS-1、配列番号7記載の塩基配列を有するDNAを含むプラスミドをpISP-1、配列番号8記載の塩基配列を有するDNAを含むプラスミドをpXSE-1、配列番号9記載の塩基配列を有するDNAを含むプラスミドをpTFE-1と命名した。

【0140】

また、上記で取得されたBamH I処理DNA断片およびBamH I処理pUC118断片を混合した後、エタノール沈殿を行い、得られたDNA沈殿物を5μlの蒸留水に溶解し、ライゲーション反応を行うことにより組換え体DNAを取得した。以後上記と同様の方法で、大腸菌を形質転換し、該大腸菌よりプラスミドを単離した。

【0141】

上記同様、該方法により単離したプラスミドを各種制限酵素で切断して構造を調べ、塩基配列を決定することにより、目的のDNA断片が挿入されているプラスミドであることを確認した。

【0142】

該プラスミドをBamH I処理し、目的のDNA断片を上記と同様の方法で回収し、発現ベクターpQE30(Qiagen社製)に常法によりサブクローニングした。

該サブクローニングにより得られた、配列番号6記載の塩基配列を有するプラスミドをpQEDXS-1と命名した。

【0143】

(2) メチルエリスリトール要求性相補遺伝子の取得

① 大腸菌メチルエリスリトール要求性変異株の取得

E. coli W3110株 (ATCC14948) を、LB液体培地に植菌し、対数増殖期まで培養した。

【0144】

培養後、得られた培養液より遠心分離により菌体を取得した。

該菌体を、0.05Mトリス-マレイン酸緩衝液 (pH 6.0) で洗浄後、菌体濃度が 10^9 細胞/mℓになるように同緩衝液に懸濁した。

【0145】

該懸濁液にNTGを終濃度が600mg/1になるように加え、室温で20分間保持して変異処理を行った。

得られた変異処理菌体をメチルエリスリトール0.1%を含むM9最少寒天培地〔モレキュラー・クローニング 第二版〕プレートに塗布し、培養した。

【0146】

メチルエリスリトールは、Tetrahedron Letters, 38, 35, 6184 (1997)に記載の方法に準じて化学合成した。

メチルエリスリトール0.1%を含むM9最少寒天培地上で生育してきたコロニーを、M9最少寒天培地とメチルエリスリトールを0.1%含むM9最少寒天培地にレプリカし、メチルエリスリトール要求性を示すもの、すなわち、メチルエリスリトールを0.1%含むM9最少寒天培地では生育できるが、M9最少寒天培地では生育できない株を目的の変異株として選択した。

【0147】

該選択により得られたメチルエリスリトール要求性変異株ME7株を以下の実験に用いた。

② メチルエリスリトール要求性相補遺伝子の取得

E. coli W3110株 (ATCC14948) をLB液体培地に植菌して対数増殖期まで培養した後、遠心分離して菌体を回収した。

【0148】

得られた菌体より、常法に従い染色体DNAを単離・精製した。

該染色体DNA 200 μgを制限酵素Sau3A Iで部分消化し、得られた消化DNA断片を、シュークロース密度勾配超遠心分離（26,000 r.p.m.、20℃、20 hr）により、サイズ分画した。

【0149】

該分画により取得された大きさが4～6 kbのDNA断片を、制限酵素BamH Iで消化したベクターpMW118（ニッポンジーン社製）にライゲーションすることにより染色体ゲノムライブラリーを作製した。

【0150】

作製した染色体ライブラリーを用い、上記①で分離されたME 7株を常法に従い形質転換した。

得られた形質転換体を、アンピシリン100 μg／l入れたLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩培養した。

【0151】

該培養において生育してきた複数のコロニーからプラスミドを抽出して塩基配列を決定した。

塩基配列を決定したクローンは配列番号10に示される塩基配列を含む配列を有していた。これらのプラスミドをpMEW41およびpMEW73と名づけた。

【0152】

該配列を有するクローンの1株より抽出したプラスミドをpMEW73と命名した。

pMEW73をHind IIIおよびSac Iで二重消化し、得られた配列番号10に示される塩基配列を有するHind III-Sac I処理DNA断片を広宿主型ベクター-pEG400 [J. Bac., 172, 2392 (1990)] のマルチクローニングサイトに連結してpEGYM1を作製した。

【0153】

上記Hind III-Sac I処理DNA断片をベクターpUC19 [Gene, 33, 103 (1985)] のHind III-Sac I部位に連結してpUCYM-1を作製した。

Genbankのデータベースに基づく大腸菌の染色体塩基配列情報より、ベクターに挿入されたDNA断片はyaeM遺伝子を含有することが分かった。

【0154】

yaeM遺伝子を十分発現させるような組換え体ベクターをPCR法〔Science, 230, 1350 (1985)〕を用いて下記方法により構築した。

配列番号20に示した配列を有するセンスプライマーおよび配列番号21に示した配列を有するアンチセンスプライマーをDNA合成機を用いて合成した。

【0155】

該センスプライマーおよびアンチセンスプライマーの5'末端にはそれぞれBamH Iの制限酵素サイトを付加させた。

染色体DNAを鋳型として、これらプライマーおよびTaq DNA polymerase (Boehringer社製)を用い、DNA Thermal Cycler (パーキンエルマージャパン社製)でPCRを行うことにより $yaeM$ 遺伝子を増幅した。

【0156】

PCRは、94°Cで30秒間、55°Cで30秒間、72°Cで2分間からなる反応工程を1サイクルと30サイクル行った後、72°Cで7分間反応させる条件を行った。

【0157】

増幅されたDNA断片およびpUC118(宝酒造社製)を制限酵素BamH Iで消化後、各々のDNA断片をアガロースゲル電気泳動によって精製した。

これら精製された両断片を混合した後エタノール沈殿を行い、得られたDNA沈殿物を5μlの蒸留水に溶解し、ライゲーション反応を行うことにより組換え体DNAを取得した。

【0158】

該組換え体DNAが $yaeM$ 遺伝子であることをDNA配列を決定することによって確認した後、発現ベクターpQE30(Qiagen社製)にサブクローニングした。

得られた組換え体DNAをpQEYM1と命名した。

【0159】

pQEYM1を用いて、ME7株を常法に従って形質転換後、該形質転換体をアンピシリン100μg/mlを含むLB寒天培地に塗布し、37°Cで一晩培養した。

該形質転換株は、野生型株と同程度の生育速度でコロニーを形成することが確認されたことより、*yaeM*遺伝子によりME7株の変異が相補されることが分かった。

【0160】

実施例2 組換え大腸菌によるユビキノン-8 (CoQ8) の生産

(1) 実施例1で取得したプラスミドpADO-1、pDXS-1、pXSE-1またはコントロールとしてpEG400をE. coli DH5 α 株にそれぞれ導入し、100 μ g/ml濃度のスペクチノマイシンに抵抗性を示す形質転換体E. coli DH5 α /pADO-1、E. coli DH5 α /pDXS-1、E. coli DH5 α /pXSE-1およびE. coli DH5 α /pEG400を各々取得した。

【0161】

チアミン(thiamine)とビタミンB₆をそれぞれ100mg/l、p-ヒドロキシ安息香酸50mg/l、スペクチノマイシン100 μ g/ml添加したLB培地を10ml入れた試験管にこれら形質転換体を植菌し、30℃で72時間振盪培養した。

【0162】

培養終了後、各々の培養液を10倍濃縮した。

各々の濃縮液300 μ lに2-ブタノール300 μ lおよびガラスピーズ300 μ lを加え、マルチビーズショッカーモード-200（安井器械社製）で5分間菌体破碎しつつ、イソプレノイド化合物の溶媒抽出を行った後、遠心分離により2-ブタノール層を採取した。

【0163】

該ブタノール層中のCoQ8を、高速液体クロマトグラフィー(LC-10A 島津製作所製)で定量分析することにより、形質転換体によるCoQ8の生産量を算定した。

【0164】

カラムはDevelosil ODS-HG-5（野村化学）を用い、メタノール:n-ヘキサン=8:2の溶液を移動相とし、流速1ml/min、測定波長275nmの条件で分析した。

結果を第1表に示す。

【0165】

【表1】

第1表 大腸菌形質転換株のC o Q 8 生産

形質転換株	生育量 [OD660]	CoQ8生産量 [mg/L]	菌体内含量 ^{*1}
E. coli DH5α/pEG400	5.8	0.63	1.1
E. coli DH5α/pAD0-1	5.5	0.98	1.8
E. coli DH5α/pDXS-1	5.2	0.85	1.6
E. coli DH5α/pXSE-1	5.6	0.67	1.2

* 1 : 菌体内含量はC o Q 8 生産量[mg/L]を10倍した値を生育量[OD660]で割った値で示した。

C o Q 8 の生成量は、コントロール株DH5α/pEG400と比較し、DH5α/pAD0-1、DH5α/pDXS-1およびDH5α/pXSE-1では有意に高かった。特に、実施例1で取得したDNAを全て導入したDH5α/pAD0-1において最も高い生産性が得られた。

【0166】

(2) M9培地を10ml入れた試験管に、上記(1)で取得したE. coli DH5α/pDXS-1またはE. coli DH5α/pEG400をそれぞれ植菌し、30℃で72時間振盪培養した。

【0167】

培養終了後、上記(1)と同様の方法により形質転換体によるC o Q 8 の生産量を算定した。

結果を第2表に示す。

【0168】

【表2】

第2表 大腸菌形質転換株のC_oQ₈生産

形質転換株	生育量 [OD660]	CoQ8生産量 [mg/L]	菌体内含量 ^{*1}
E. coli DH5 α / pEG400	3.1	0.49	1.6
E. coli DH5 α / pDXS-1	2.5	1.02	4.1

* 1 : 菌体内含量はC_oQ₈生産量[mg/L]を10倍した値を生育量[OD660]で割った値で示した。

C_oQ₈の生成量は、コントロール株DH5 α / pEG400と比較し、DH5 α / pDXS-1では有意に高かった。

【0169】

(3) 組換え大腸菌によるC_oQ₈の生産

実施例1で取得したプラスミドpEGYM1またはコントロールとしてpEG400をE. coli DH5 α 株に導入し、100 μ g/ml濃度のスペクチノマイシンに抵抗性を示す形質転換体E. coli DH5 α / pEGYM1およびE. coli DH5 α / pEG400を各々取得した。

【0170】

グルコース1%、ビタミンB₁ 100mg/l、ビタミンB₆ 100mg/l、p-ハイドロキシ安息香酸 50mg/l添加したLB培地を10ml入れた試験管にこれら形質転換体を植菌し、30℃で72時間振盪培養した。

【0171】

培養終了後、上記(1)と同様の方法により形質転換体によるC_oQ₈の生産量を算定した。

結果を第3表に示す。

【0172】

【表3】

第3表 大腸菌形質転換株のCoQ8生産

形質転換株	生育量 [OD660]	CoQ8生産量 [mg/L]	菌体内含量*1
E. coli DH5α/pEG400	14.44	0.83	0.57
E. coli DH5α/pEGYM1	13.12	0.94	0.71

* 1 : 菌体内含量はCoQ8生産量[mg/L]を10倍した値を生育量[OD660]で割った値で示した。

CoQ8の生成量は、コントロール株DH5α/pEG400と比較し、DH5α/pEGYM1では有意に高かった。

【0173】

実施例3 組換え大腸菌によるメナキノン-8(MK-8)の生産

(1) スペクチノマイシンを100 μg/ml添加したTB培地〔バクトリップトン(ディフコ社製) 12 g、酵母エキス(ディフコ社製) 24 g、グリセロール 5 gを水900 mlに溶解し、KH₂PO₄を0.17M、K₂HPO₄を0.72M含有する水溶液を100 ml加えて調製した培地〕を10 ml入れた試験管に、実施例2(1)で取得した、E. coli DH5α/pAD0-1またはE. coli DH5α/pEG400をそれぞれ植菌し、30℃で72時間振盪培養した。

【0174】

培養終了後、実施例2(1)のCoQ8の定量法と同様の方法によりMK-8を定量し、形質転換体によるMK-8の生産量を算定した。

結果を第4表に示す。

【0175】

【表4】

第4表 大腸菌形質転換株のMK-8生産

形質転換株	生育量 [OD660]	MK-8生産量 [mg/L]	菌体内含量*1
E. coli DH5α/pEG400	23.2	1.1	0.46
E. coli DH5α/pAD0-1	23.5	1.8	0.75

* 1 : 菌体内含量はC_oQ₈生産量[mg/L]を10倍した値を生育量[OD660]で割った値で示した。

MK-8の生産量は、コントロール株DH5α/pEG400と比較して、DH5α/pAD0-1では有意に高かった。

(2) 実施例2(1)で取得したE. coli DH5α/pDXS-1またはE. coli DH5α/pEG400を、上記(1)と同様の方法で培養し、形質転換体によるMK-8の生産量を算定した。

結果を第5表に示す。

【0176】

【表5】

第5表 大腸菌形質転換株のMK-8生産

形質転換株	生育量 [OD660]	MK-8生産量 [mg/L]	菌体内含量*1
E. coli DH5α/pEG400	42.8	2.41	0.56
E. coli DH5α/pDXS-1	44.0	2.96	0.67

* 1 : 菌体内含量はC_oQ₈生産量[mg/L]を10倍した値を生育量[OD660]で割った値で示した。

MK-8の生産量は、コントロール株DH5α/pEG400と比較して、DH5α/pDXS-1では有意に高かった。

【0177】

実施例4 Erwinia carotovoraによるC_oQ₈の生産

実施例1で取得したプラスミドpDXS-1またはコントロールとしてpEG400をErwinia carotovora IF0-3380株に導入し、100μg/ml濃度のス

ペクチノマイシンに抵抗性を示す形質転換体IFO-3380/pDXS-1およびIFO-3380/pEG400を取得した。

【0178】

スペクチノマイシンを $100\mu g/ml$ 添加したLB培地を $10ml$ 入れた試験管にこれら形質転換体を植菌し、 $30^{\circ}C$ で72時間振盪培養した。

培養終了後、実施例2(1)と同様の方法により形質転換体によるCoQ8の生産量を算定した。

結果を第6表に示す。

【0179】

【表6】

第6表 Erwinia carotovora形質転換株によるCoQ8生産

形質転換株	生育量 OD660	CoQ8生産量 mg/L	菌体内含量 ^{*1}
IFO-3380/pEG400	1.68	0.26	1.5
IFO-3380/pDXS-1	2.48	0.45	1.8

*1：菌体内含量はCoQ8生産量[mg/L]を10倍した値を生育量[OD660]で割った値で示した。

CoQ8の生成量は、コントロール株IFO-3380/pEG400と比較し、IFO-3380/pDXS-1では有意に高かった。

【0180】

実施例5：Erwinia uredovoraによるユビキノンおよびカロテノイドの生産

実施例1で取得したプラスミドpUCYM-1、pQEDXS-1、pQEYEM-1またはコントロールとしてpUC19およびpQE30をエレクトロポレーション法によりErwinia uredovora DSM-30080株に導入し、 $100\mu g/ml$ 濃度のアンピシリンに抵抗性を示す形質転換体E. uredovora DSM-30080/pUCYM-1、E. uredovora DSM-30080/pQEDXS-1、E. uredovora DSM-30080/pQEYEM-1、E. uredovora DSM-30080/pUC19およびE. uredovora DSM-30080/pQE30を取得した。

【0181】

アンピシリン $100\mu g/ml$ 、グルコース1%、ビタミンB₁ 100mg

／1、ビタミンB₆ 100mg／1、p-ハイドロキシ安息香酸 50mg／1
添加したLB培地を10ml入れた試験管にこれら形質転換体を植菌し、30℃
で72時間振盪培養した。

【0182】

培養終了後、実施例2(1)と同様の方法により形質転換体によるCoQ8の生産量を算定した。

カロテノイド色素の生産量は、実施例2(1)と同様の方法により得られた2-ブタノール層を分光光度計を用い、450nmの吸光度を測定することにより算出した。

結果を第7表に示す。

【0183】

【表7】

第7表 E. uredovora 形質転換株によるCoQ8およびカロテノイド生産

形質転換株	生育量 OD660	CoQ8		カロテノイド	
		生産量 mg/L	菌体内含量比 相対値	生産量 相対値	菌体内含量比 相対値
DSM-30080/pUC19	2.00	1.15	1.0	1.0	1.0
DSM-30080/pUCYM-1	1.88	1.39	1.3	1.5	1.6
DSM-30080/pQE30	2.52	1.29	1.0	1.0	1.0
DSM-30080/pQEY-1	1.92	1.36	1.4	1.7	2.2
DSM-30080/pQEDXS-1	2.12	3.21	3.0	5.6	6.7

CoQ8の生産量およびカロテノイド色素の生産量とともに、コントロール株DSM-30080/pUC19と比較し、DSM-30080/pUCYM-1では有意に高かった。

同様に、CoQ8の生産量およびカロテノイド色素の生産量とともに、コントロール株DSM-30080/pQE30と比較し、DSM-30080/pQEY-1およびDSM-30080/pQEDXS-1では有意に高かった。

【0184】

実施例6 光合成細菌Rhodobacter sphaeroidesからのイソプレノイド化合物の生合成に関与する蛋白質をコードするDNAの取得

(1) R. sphaeroidesからのDXS遺伝子の取得

大腸菌で見出されたDXS遺伝子配列を用いて、他生物種で保存されているDXSホモログをgenbankより検索した。その結果、Haemophilus influenzae(P45205)、R. hodobacter capsulatus(P26242)、Bacillus subtilis(P54523)、Synechocystis sp. PCC6803(P73067)およびMycobacterium tuberculosis(007184)等でホモログが見出された。これら配列を比較して、高度に保存されているアミノ酸配列を選択した。保存アミノ酸配列に対応する塩基配列をR. sphaeroidesのコドン使用頻度を考慮にいれて設計し、センスプライマーとして配列番号32および配列番号33に記載の塩基配列を有するDNA断片を、アンチセンスプライマーとして配列番号34を有するDNA断片をDNA合成機を用いて合成した。

【0185】

R. sphaeroides KY4113株(FERM-P4675)の染色体DNAを鋳型として、上記プライマーと、ExpandTM High-Fidelity PCR System(ベーリンガー・マンハイム社製)を用い、DNA Thermal Cycler(パーキンエルマージャパン社製)でPCRを行った。

【0186】

PCRは、94℃で40秒間、60℃で40秒間、72℃で1分間からなる反応工程を1サイクルとして、30サイクル行った後、72℃で7分間反応させる条件で行い、目的とするDNA断片を取得した。このDNA断片をDIG DNA Labeling Kit(ベーリンガー・マンハイム社製)を用いてDIG標識した。

【0187】

R. sphaeroidesのDXS遺伝子全長を取得するため、KY4113株のゲノムライブラリーを作成した。KY4113株をLB培地で一晩培養し、染色体DNAを抽出した。制限酵素Sau3AIで部分消化してショ糖密度勾配超遠心法により4~6kbのDNA断片を精製した。該DNA断片とBamH I消化したベクターpUC19をLigation Pack(ニッポンジーン社製)を用いて連結し、大腸菌DH5 α に形質転換した。形質転換体をアンピシリン100 μ g/mlを含むLBプレートに塗布し、約10000個のコロニーを得た。

【0188】

上記方法で取得したD I G標識DNA断片をプローブとして、コロニーハイブリダイゼーション法によるスクリーニングをしたところ、2種類のDNA断片が検出された。各々をシークエンスしたところ、それぞれのDNA断片から他生物種の既知DXS遺伝子と相同性の高いORFが見出された。配列番号26に示すアミノ酸配列をDXS1、配列番号27に示すアミノ酸配列をDXS2と命名した。

【0189】

(2) 大腸菌DXS遺伝子欠損株を用いた相補性確認

① 大腸菌DXS遺伝子欠損株の取得

E. coli W3110株(ATCC14948)を、LB液体培地に植菌し、対数増殖期まで培養した。培養後、得られた培養液より遠心分離により菌体を取得した。

【0190】

該菌体を、0.05Mトリス-マレイン酸緩衝液(pH6.0)で洗浄後、菌体濃度が 10^9 細胞/mlになるように同緩衝液に懸濁した。

該懸濁液にNTGを終濃度が600mg/lになるように加え、室温で20分間保持して変異処理を行った。

【0191】

得られた変異処理菌体を1-デオキシキシリース0.1%を含むM9最少寒天培地〔モレキュラー・クローニング 第二版〕プレートに塗布して培養した。

1-デオキシキシリースは、J. C. S. Perkin Trans I, 2131-2137 (1982)に記載の方法に準じて化学合成した。

【0192】

1-デオキシキシリース0.1%を含むM9最少寒天培地上で生育してきたコロニーを、M9最少寒天培地と1-デオキシキシリースを0.1%含むM9最少寒天培地にレプリカし、1-デオキシキシリースを0.1%含むM9最少寒天培地では生育できるが、M9最少寒天培地では生育できない、1-デオキシキシリース要求性を示す株を目的の変異株として選択した。

【0193】

該方法で選択され、取得された変異株をME1株と命名した。

該ME1株にpDXS-1を導入したところ、1-デオキシキシリース要求性を相補したことから、ME1株はDXS遺伝子が欠損した株であると判断した。

【0194】

(3) DXS1およびDXS2の相補性試験

KY4113株由来の、配列番号27からなるDXS1をコードするDNA断片、および配列番号29からなるDXS2をコードするDNA断片を各々ベクタ-pUC19のlacプロモータ下流に連結したプラスミドを構築した。

【0195】

これら構築したプラスミドをそれぞれME1株に導入したところ、DXS1およびDXS2いずれもME1株の1-デオキシキシリース要求性を相補した。

以上のことから、*R. sphaeroides*はピルビン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸から1-デオキシーD-キシリース5-リン酸を生成する反応を触媒する活性を有するDXS1およびDXS2のDXS遺伝子を2つ持つことが判明した。

【0196】

(4) *R. sphaeroides*由来メチルエリスリトール要求性相補遺伝子の取得

実施例1(2)①で得られた大腸菌メチルエリスリトール要求性変異株ME7株を、メチルエリスリトール0.1%含むLB液体培地に植菌して対数増殖期まで培養した後、遠心分離して菌体を回収した。

【0197】

該菌体を10%グリセロールを含む1mM HEPES水溶液で2回洗浄して培地成分を可能な限り除去した。

該洗浄菌体に、実施例6(1)で作成した*R. sphaeroides* KY4113株のゲノムライブラリーから抽出したプラスミドを、常法に従い、エレクトロポレーションにより導入した。

【0198】

導入後、アンピシリン100μg/1を含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩培養した。

生育してきたコロニーを釣菌し、LB液体培地に植菌して培養し、該培養菌体

よりプラスミドを抽出した。

【0199】

抽出したプラスミドをME7株に再導入したところ、メチルエリスリトールを含まない培地でも生育したことから、抽出したプラスミドにR. sphaeroides由来のメチルエリスリトール要求性を相補するDNA断片が含まれていることを確認した。

【0200】

本DNA断片の塩基配列を決定した結果、配列番号31からなる、大腸菌yaemと相同性の高いアミノ酸配列をコードするDNA配列が見出された。

【0201】

実施例7 組換え光合成細菌によるユビキノン-10(CoQ10)の生産

実施例6で取得した配列番号27からなるDNA断片DXS1および配列番号29からなるDNA断片DXS2の上流に、KY4113株由来のglnBプロモーターを連結し、広宿主域ベクターpEG400に挿入して作成したプラスミドをpRSDFX-1およびpRSDFX-2と命名した。また、yaemとDXS1をタンデムに連結し、glnBプロモータ下流に連結したプラスミドを構築し、pRSYMDX1と命名した。これらプラスミドを、エレクトロポレーション(Bio-Rad社製)によりR. sphaeroides KY4113株に導入した。

【0202】

導入後、100μg/ml濃度のスペクチノマイシンを含むLB寒天培地に塗布し、30℃で3日間培養した。

生育してきたコロニーを100μg/ml濃度のスペクチノマイシンを含むLB培地に植菌して一晩培養後、培養菌体を遠心分離により回収した。

【0203】

得られた菌体よりプラスミド抽出(Qiagen社製)し、各々導入したプラスミドを保持していることを確認した。このようにして得られた形質転換体をKY4113/pRSDFX-1、KY4113/pRSDFX-2、KY4113/pRSYMDX1およびKY4113/pEG400と命名した。

【0204】

種培地〔グルコース 2%、ペプトン 1%、酵母エキス 1%、NaCl 0.

5% (pH 7.2、NaOHで調整)】を5ml入れた試験管に各形質転換体を一白金耳植菌し、30℃で24時間培養した。

【0205】

得られた培養液0.5mlを、ユビキノン-10生産培地（廃糖蜜4%、グルコース2.7%、コーンスチーブリカ-4%、硫酸アンモニウム0.8%、リン酸1カリウム0.05%、リン酸2カリウム0.05%、硫酸マグネシウム・7水和物0.025%、硫酸第一鉄・7水和物3mg/l、チアミン8mg/l、ニコチン酸8mg/l、トレースエレメント1ml/lを含む培地をpH9に調整後、炭酸カルシウム1%を添加してオートクレーブ滅菌したもの）を5ml入れた試験管に添加し、30℃で5日間振盪培養した。

【0206】

培養終了後実施例2(1)のCoQ8の定量法と同様の方法により、形質転換体によるCoQ10の生産量を算定した。結果を表8に示す。

【0207】

【表8】

第8表

	生育量[OD660]	CoQ10蓄積量[mg/l]
KY4113/pEG400	23.7	65.2
KY4113/pRSDX-1	23	81
KY4113/pRSDX-2	24.4	81.9
KY4113/pRSYMDX1	25.8	117.9

CoQ10生成量は、コントロール株KY4113/pEG400と比較しKY4113/pRSDX-1、KY4113/pRSDX-2およびKY4113/pRSYMDX1では有意に高かった。

【0208】

実施例8 yaem遺伝子がコードする酵素の活性測定

(1) yaem遺伝子の高発現化

yaem遺伝子を十分発現させるような組換え体プラスミドをPCR法[Science, 230, 1350 (1985)]を用いて下記方法により構築した。

【0209】

配列番号24に示した配列を有するセンスプライマーおよび配列番号25に示した配列を有するアンチセンスプライマーをDNA合成機を用いて合成した。

該センスプライマーおよびアンチセンスプライマーの5'末端にはそれぞれBamH Iの制限酵素サイトを付加させた。

【0210】

染色体DNAを鑄型として、これらプライマーおよびTaq DNA polymerase(ベーリンガー社製)を用い、DNA Thermal Cycler(パーキンエルマージャパン社製)でPCRを行うことによりyaeM遺伝子を増幅した。

【0211】

PCRは、94℃で30秒間、55℃で30秒間、72℃で2分間からなる反応工程を1サイクルと30サイクル行った後、72℃で7分間反応させる条件を行った。

増幅されたDNA断片およびpUC118(宝酒造社製)を制限酵素BamH Iで消化後、各々のDNA断片をアガロースゲル電気泳動によって精製した。

【0212】

これら精製された両断片を混合した後エタノール沈殿を行い、得られたDNA沈殿物を5μlの蒸留水に溶解し、ライゲーション反応を行うことにより組換えDNAを取得した。

該組換えDNAがyaeM遺伝子であることをDNA配列を決定することによって確認した。

【0213】

該組換えDNAからプラスミドを抽出し、制限酵素制限酵素BamH Iで消化後、アガロースゲル電気泳動を行いBamH I処理yaeM遺伝子含有DNA断片を取得した。

pQE30(QIAGEN社製)を制限酵素BamH Iで消化後、アガロースゲル電気泳動を行いBamH I処理pQE30断片を取得した。

【0214】

上記で取得されたBamH I処理yaeM遺伝子含有DNA断片をBamH I消化pQE30断片と混合した後、エタノール沈殿を行い、得られたDNA沈殿物を

5 μl の蒸留水に溶解し、ライゲーション反応を行うことにより組換え体DNAを取得した。

【0215】

該組換え体DNAを用い、E. Coli JM109株を常法に従って形質転換後、該形質転換体をアンピシリン100 μg/mlを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩培養した。

【0216】

上記と同様の方法で、該大腸菌よりプラスミドを単離した。

上記同様、該方法により単離したプラスミドを各種制限酵素で切斷して構造を調べ、塩基配列を決定することにより、目的のDNA断片が挿入されているプラスミドであることを確認した。このプラスミドをpQEDXRと命名した。

【0217】

(2) yaeM遺伝子産物の活性測定

① yaeM遺伝子産物の精製

(1) で作成したpQEDXRを常法によりpREP4を有するE. coli M15株(QIAGEN社製)に導入し、アンピシリン200 μg/ml、カナマイシン25 μg/mlに耐性を示すM15/pREP4+pQEDXR株を得た。

【0218】

M15/pREP4+pQEDXR株をアンピシリン200 μg/ml、カナマイシン25 μg/mlを含むLB液体培地100 ml中、37℃で培養し、660 nmの濁度が0.8に達した時点でイソプロピルチオガラクトシドを終濃度0.2 mMになるように添加した。さらに37℃で5時間培養した後、遠心分離(3000 rpm、10分間)によって培養上清を除いた。この菌体を100 mMトリス塩酸緩衝液(pH 8.0) 6 mlに懸濁し、超音波破碎機(SONIFIER, BRANSON社製)を用いて氷冷しつつ破碎した。得られた菌体破碎液を遠心分離(10,000 rpm、20分間、4℃)にかけ、上清を回収した。この細胞抽出液遠心上清をNi-NTAレジンカラム(QIAGEN社製)に通し、20 mlの洗浄緩衝液[100 mM トリス塩酸(pH 8.0)、50 mM イミダゾール、0.5% Tween 20]で洗浄した。ついで溶出緩衝液[100 mM トリス塩酸(pH 8.0)、200 mM イミ

ダゾール] 10mlを通塔し、溶出液を1mlづつ分画した。

【0219】

各分画について蛋白量を測定(BioRad社の蛋白量定量キット使用)し、蛋白質を含む画分を精製蛋白画分とした。

② 基質1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸の調製

反応基質である1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸は以下のようにして調製した。1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸の検出は、HPLC [カラム: Senshu pak NH2-1251-N(4.6 x 250mm, Senshu社製)、移動層: 100mM KH₂PO₄(pH 3.5)]によって195nmの吸光度を測定する方法で行った。

【0220】

大腸菌のd x s遺伝子を高発現するプラスミドpQDXS-1を上記と同様にE.coli M15/pREP4株に導入し、M15/pREP4+pQDXS-1株を得た。

該株を実施例8(2)①と同様に培養し、Ni-NTAレジンカラムを用いてd x s酵素蛋白質を精製した。

【0221】

該精製d x s蛋白質を20mlの反応液[100mM トリス塩酸(pH 7.5)、10mM ピルビン酸ナトリウム、30mM DL-グリセルアルデヒド-3-リン酸、1.5mM チアミンピロリン酸、10mM MgCl₂、1mM DL-ジチオスレイトール]に加え37℃で保温した。

【0222】

12時間反応した後、反応液を水で300mlに希釈し、活性炭カラム(2.2 x 8cm)を通した後、Dowex 1-X8(C1型、3.5 x 25cm)に通塔し、1%食塩水で溶出した。溶出画分を濃縮後、Sephadex G-10(1.8 x 100cm)に通塔し、水で溶出した。1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸含有画分を凍結乾燥し、約50mgの白色粉末を得た。

【0223】

該粉末が1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸であることをNMR分析(A-500、日本電子社製)で確認した。

③ yaeM遺伝子産物の酵素活性測定

100 mM トリス塩酸(pH 7.5)、1 mM MmC12、0.3 mM NADPHと実施例8(2)①で得たyaeM遺伝子産物を含む反応液1mlに、上記のように合成した1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸0.3 mM(終濃度)を加え、37℃でインキュベートした。インキュベート中のNADPHの増減を340 nMの吸光を分光光度計(UV-160、島津社製)で測定する方法で追跡したところ、経時的にNADPHが減少することが分かった。

【0224】

上記反応産物の構造を確認するため、以下のようにスケールを大きくして反応を行い、産物を単離した。1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸の濃度を0.15 mMとした以外は上記と同じ組成の反応液200 mlを、同様に37℃で30分間インキュベートした後、その全量を活性炭カラムに通し、通過液を水で1Lに希釈した後、Dowex 1-X8(Cl-型、3.5 x 20 cm)カラムに通塔した。

【0225】

1%食塩水400 mlで溶出し、Sephadex G-10(1.8 x 100 cm)に通塔し、水で溶出した。溶出画分を凍結乾燥することで、反応産物を単離した。

HR-FABMS解析から単離された反応産物の分子式は $C_5H_{12}O_7P$ [m/z 215.0276 ($M-H^-$)、 $\Delta - 4.5 \text{ mmu}$]と推定された。 1H および ^{13}C NMR解析から、以下のケミカルシフトが得られた。

【0226】

1H NMR(D_2O , 500 MHz): δ 4.03(ddd, $J=11.5, 6.5, 2.5 \text{ Hz}$, 1H), 3.84(ddd, $J=11.5, 8.0, 6.5 \text{ Hz}$, 1H), 3.78(dd, $J=80, 2.5 \text{ Hz}$, 1H), 3.60(d, $J=12.0 \text{ Hz}$, 1H), 3.50(d, $J=12.0 \text{ Hz}$, 1H), 1.15(s, 3H); ^{13}C NMR(D_2O , 125 MHz): δ 75.1(C-2), 74.8(C-3), 67.4(C-1), 65.9(C-4), 19.4(2-Me)

この反応産物をアルカリ性ホスファターゼ(宝酒造社製)で処理して得られる化合物を 1H および ^{13}C NMR解析して得られるケミカルシフトは、Tetrahedron Letter, 38, 6184 (1997)に記載の方法で合成した2-C-メチル-D-エリスリトールのNMR解析で得られるケミカルシフトと完全に一致した。

【0227】

さらに前者の旋光度は $[\alpha]_D^{21} = +6.0$ ($c=0.050, H_2O$) で、報告されている [Tetrahedron Letter, 38, 6184 (1997)] 2-C-メチル-D-エリスリトールの旋光度 $[\alpha]_D^{25} = +7.0$ ($c=0.13, H_2O$) と一致した。

【0228】

これらの結果から、yaeM遺伝子産物の反応産物は 2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸であることが明らかになった。即ち、yaeM遺伝子産物は NADPH の消費を伴いながら 1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸から 2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸を生じる活性を有することが判明した。この触媒活性に基づき、本酵素を 1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸レダクトイソメラーゼと命名した。

【0229】

④ 1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸レダクトイソメラーゼの性質

実施例8 (2) ③に記した 1m1 反応系を用いて、1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸レダクトイソメラーゼの酵素学的性質を調べた。なお 1u とは 1 分間に 1 mmol の NADPH を酸化する活性と定義する。

【0230】

NADPH を NADH に置換した場合、活性は 1/100 以下に低下した。

1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸の代りに 1-デオキシ-D-キシリロースを用いると全く反応は起らなかった。

【0231】

SDS-PAGE 解析から、本酵素は 42 kDa ポリペプチドから構成されていることが分かった。

反応系への金属添加効果を第9表に示した。

【0232】

【表9】

第9表 1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸レダクトイソメラーゼ活性に及ぼす各種金属イオンの影響

添加物	比活性 (units/mg protein)
なし	0.3
EDTA	N.D.
MnCl ₂	11.8
CoCl ₂	6.0
MgCl ₂	4.0
CaCl ₂	0.2
NiSO ₄	0.2
ZnSO ₄	0.3
CuSO ₄	N.D.
FeSO ₄	N.D.

各種金属イオンおよびEDTAは1mMになるように添加した。

N.D.は活性が検出できなかったことを示す。

MnCl₂存在下での1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸、NADPHへのK_mは、それぞれ249 μM、7.4 μMだった。

反応温度の影響を図1に、反応pHの影響を図2に示した。

【0233】

実施例9 yaeM欠損変異株の作成と性質

(1) yaeM欠損変異株の作成

1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸レダクトイソメラーゼが細胞の生育に必須か否かを調べるため、以下のようにしてその欠損変異株を作成した。

【0234】

yaem遺伝子中に挿入するためのカナマイシン耐性遺伝子カセットを以下のようにして作成した。

実施例1(2)②で得たプラスミドpMEW41を制限酵素BaiIで消化後アガロースゲル電気泳動し、BaiI処理DNA断片を取得した。

【0235】

Tn5を制限酵素HindIIIとSmaIで消化した後、DNA blunting kit（宝酒造社製）を用いて断片の末端を平滑化した。

得られた平滑化DNA断片を先に作成したBamII処理pMEW41DNA断片と混合した後、エタノール沈殿を行い、得られたDNA沈殿物を5μlの蒸留水に溶解し、ライゲーション反応を行うことにより組換え体DNAを取得した。

【0236】

該組換え体DNAを用い、E. coli JM109株（宝酒造より購入）を常法に従って形質転換後、該形質転換体をアンピシリン100μg/mlとカナマイシン15μg/mlを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩培養した。

【0237】

生育してきたアンピシリン耐性の形質転換体のコロニー数個について、アンピシリン100μg/mlとカナマイシン15μg/mlを含むLB液体培地10mlで37℃16時間振盪培養した。

得られた培養液を遠心分離することにより菌体を取得した。

【0238】

該菌体より常法に従ってプラスミドを単離した。

該方法により単離したプラスミドを各種制限酵素で切斷して構造を調べ、目的のDNA断片が挿入されているプラスミドであることを確認した。このプラスミドをpMEW41Kmと名づけた。

【0239】

pMEW41Kmを用いて、相同組換えによる染色体上のyaem遺伝子の破壊を行った。組換えの模式図を図3に示した。

pMEW41Kmを制限酵素HindIIIとSacIで消化し、アガロースゲル電気泳動を行い直鎖状の断片を精製した。この断片を用いて常法に従って、大腸菌FS1576株を形質転換した。FS1576株は国立遺伝学研究所よりME9019株の名で入手可能である。該形質転換体をカナマイシン15μg/mlと2-C-メチル-D-エリスリトール1g/lを含むLB寒天培地に塗布し、37℃で一晩培養した。

【0240】

生育してきたカナマイシン耐性コロニー数個について、カナマイシン $15\mu g/m^l$ と2-C-メチル-D-エリスリトール $1g/l$ を含むLB液体培地 $10m^l$ で $37^\circ C$ 16時間振盪培養した。

【0241】

得られた培養液を遠心分離することにより菌体を取得した。

該菌体より常法に従って染色体DNAを単離した。

染色体DNAを制限酵素SmaIまたはPstIで消化した。またFS1576株の染色体についても同様に処理した。常法に従って、これら制限酵素処理DNAをアガロースゲル電気泳動後、カナマイシン耐性遺伝子およびyaeM遺伝子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析に供した。その結果、カナマイシン耐性コロニーの染色体は図3に示した構造をとっており、目的どおりyaeM遺伝子がカナマイシン耐性遺伝子で分断破壊されていることが確かめられた。

【0242】

(2) yaeM欠損変異株の性質

上記の手順で作成されたyaeM欠損株およびその親株であるFS1576株を、LB寒天培地および2-C-メチル-D-エリスリトール $1g/l$ を含むLB寒天培地に塗布し、 $37^\circ C$ で培養した。2日後の生育度合いを第10表に示した。

【0243】

【表10】

第10表 大腸菌の生育に対するyaeM遺伝子の欠損の影響

菌株	各培地上での菌の生育 ^{*1}	
	LB	LB+ME ^{*2}
FS1576	+	+
yaeM欠損株	-	+

*1：生育度合い +；良好に生育、-；生育せず

*2：MEは2-C-メチル-D-エリスリトール $1g/l$ 添加を表す。

yaeM欠損変異株は2-C-メチル-D-エリスリトールを添加しない培地

では生育できないため、2-C-メチル-D-エリスリトール非存在下では本遺伝子が細胞の生育に必須であることが明白となった。

【0244】

実施例10 1-デオキシーD-キシルロース5-リン酸レダクトイソメラーゼ阻害剤が菌の生育に及ぼす効果

1-デオキシーD-キシルロース5-リン酸レダクトイソメラーゼ反応の産物である2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸やこの酵素反応で想定される反応中間体とフォスマドマイシンは構造的に似ているため、フォスマドマイシンが該酵素を阻害する可能性があるとの推定の基に以下の実験をおこなった。

【0245】

実施例8に示した1-デオキシーD-キシルロース5-リン酸レダクトイソメラーゼ活性測定系にフォスマドマイシンを添加し、酵素活性への影響を調べた。

フォスマドマイシンは [Chem. Pharm. Bull., 30, 111-118 (1982)] に記載の方法に従って合成した。

【0246】

実施例8(2)③に示した反応系を0.2mlにスケールダウンした系(各濃度は同じ)に各種濃度のフォスマドマイシンを添加し、37℃でインキュベートし、NADPHの増減をベンチマークマイクロプレートリーダー(バイオラド社製)を用いて測定した。

【0247】

図4に示したように、フォスマドマイシンは1-デオキシーD-キシルロース5-リン酸レダクトイソメラーゼを阻害することが判った。

大腸菌W3110株をLB寒天培地、フォスマドマイシンを3.13mg/1含むLB寒天培地およびフォスマドマイシン3.13mg/1と2-C-メチル-D-エリスリトール0.25g/1を含むLB寒天培地にそれぞれ塗布し、37℃で培養した。

【0248】

培養2日後において、LB寒天培地、フォスマドマイシンおよび2-C-メチル-D-エリスリトール0.25g/1を含むLB寒天培地上の2種類の培地で

は菌は生育することができたが、フォスミドマイシンだけを添加したLB寒天培地では菌は生育することができなかった。

【0249】

これらの結果から、フォスミドマイシンが1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸レダクトイソメラーゼを阻害することによって菌の生育を阻害することが明白となった。以上のことから、yaeM(1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸レダクトイソメラーゼ)の活性を阻害する物質は有効な抗菌剤あるいは除草剤となり得る。

【0250】

【発明の効果】

本発明によれば、心疾患、骨粗鬆症、止血、がん予防、免疫賦活等を目的とした医薬品、健康食品および貝類付着防止塗料等に有用なイソプレノイド化合物の生合成に関するDNAを1つ以上含むDNAをベクターに組み込み、得られた組換え体DNAを原核生物由来の宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培地に培養し、培養物中にイソプレノイド化合物を生成蓄積させ、該培養物からイソプレノイド化合物を採取することを特徴とする、イソプレノイド化合物の製造法、イソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質をコードするDNAを1つ以上含むDNAをベクターに組み込み、得られた組換え体DNAを宿主細胞に導入し、得られた形質転換体を培地に培養し、培養物中に該蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする、該蛋白質の製造法、および該蛋白質、ならびに1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸から2-C-メチル-D-エリスリトール4-リン酸を生じる反応を触媒する活性を有する新規な酵素蛋白質および該酵素を阻害する物質を探索することによる、抗菌およびまたは除草活性を有する化合物の探索方法を提供することができる。

【0251】

【配列表フリーテキスト】

配列番号12：合成DNA

配列番号13：合成DNA

配列番号14：合成DNA

配列番号15：合成DNA

配列番号16：合成DNA

配列番号17：合成DNA

配列番号18：合成DNA

配列番号19：合成DNA

配列番号20：合成DNA

配列番号21：合成DNA

配列番号22：合成DNA

配列番号23：合成DNA

配列番号24：合成DNA

配列番号25：合成DNA

配列番号32：合成DNA

配列番号33：合成DNA

配列番号34：合成DNA

【0252】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> A METHOD OF PRODUCING A ISOPRENOID COMPOUND AND A METHOD OF SCREENING A COMPOUND HAVING ANTIBIOTIC OR WEED KILLER ACTIVITY

<130> H11-0091N2

<140>

<141>

<150> H10-103101

<151> 1998-04-14

<150> H10-221910

<151> 1998-08-05

<160> 34

<170> PatentIn Ver. 2.0

【0253】

<210> 1

<211> 620

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 1

特平 1 1 - 0 3 5 7 3 9

Met Ser Phe Asp Ile Ala Lys Tyr Pro Thr Leu Ala Leu Val Asp Ser

1

5

10

15

Thr Gln Glu Leu Arg Leu Leu Pro Lys Glu Ser Leu Pro Lys Leu Cys

20

25

30

Asp Glu Leu Arg Arg Tyr Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Ser Ser Gly

35

40

45

His Phe Ala Ser Gly Leu Gly Thr Val Glu Leu Thr Val Ala Leu His

50

55

60

Tyr Val Tyr Asn Thr Pro Phe Asp Gln Leu Ile Trp Asp Val Gly His

65

70

75

80

Gln Ala Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Lys Ile Gly

85

90

95

Thr Ile Arg Gln Lys Gly Gly Leu His Pro Phe Pro Trp Arg Gly Glu

100

105

110

Ser Glu Tyr Asp Val Leu Ser Val Gly His Ser Ser Thr Ser Ile Ser

115

120

125

Ala Gly Ile Gly Ile Ala Val Ala Ala Glu Lys Glu Gly Lys Asn Arg

130

135

140

Arg Thr Val Cys Val Ile Gly Asp Gly Ala Ile Thr Ala Gly Met Ala

145

150

155

160

Phe Glu Ala Met Asn His Ala Gly Asp Ile Arg Pro Asp Met Leu Val

165	170	175
-----	-----	-----

Ile Leu Asn Asp Asn Glu Met Ser Ile Ser Glu Asn Val Gly Ala Leu

180	185	190
-----	-----	-----

Asn Asn His Leu Ala Gln Leu Leu Ser Gly Lys Leu Tyr Ser Ser Leu

195	200	205
-----	-----	-----

Arg Glu Gly Gly Lys Lys Val Phe Ser Gly Val Pro Pro Ile Lys Glu

210	215	220
-----	-----	-----

Leu Leu Lys Arg Thr Glu Glu His Ile Lys Gly Met Val Val Pro Gly

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Asn Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly

245	250	255
-----	-----	-----

His Asp Val Leu Gly Leu Ile Thr Thr Leu Lys Asn Met Arg Asp Leu

260	265	270
-----	-----	-----

Lys Gly Pro Gln Phe Leu His Ile Met Thr Lys Lys Gly Arg Gly Tyr

275	280	285
-----	-----	-----

Glu Pro Ala Glu Lys Asp Pro Ile Thr Phe His Ala Val Pro Lys Phe

290	295	300
-----	-----	-----

Asp Pro Ser Ser Gly Cys Leu Pro Lys Ser Ser Gly Gly Leu Pro Ser

特平 1 1 - 0 3 5 7 3 9

305

310

315

320

Tyr Ser Lys Ile Phe Gly Asp Trp Leu Cys Glu Thr Ala Ala Lys Asp

325

330

335

Asn Lys Leu Met Ala Ile Thr Pro Ala Met Arg Glu Gly Ser Gly Met

340

345

350

Val Glu Phe Ser Arg Lys Phe Pro Asp Arg Tyr Phe Asp Val Ala Ile

355

360

365

Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Ile Gly Gly

370

375

380

Tyr Lys Pro Ile Val Ala Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Ala Tyr

385

390

395

400

Asp Gln Val Leu His Asp Val Ala Ile Gln Lys Leu Pro Val Leu Phe

405

410

415

Ala Ile Asp Arg Ala Gly Ile Val Gly Ala Asp Gly Gln Thr His Gln

420

425

430

Gly Ala Phe Asp Leu Ser Tyr Leu Arg Cys Ile Pro Glu Met Val Ile

435

440

445

Met Thr Pro Ser Asp Glu Asn Glu Cys Arg Gln Met Leu Tyr Thr Gly

450

455

460

Tyr His Tyr Asn Asp Gly Pro Ser Ala Val Arg Tyr Pro Arg Gly Asn
 465 470 475 480

Ala Val Gly Val Glu Leu Thr Pro Leu Glu Lys Leu Pro Ile Gly Lys
 485 490 495

Gly Ile Val Lys Arg Arg Gly Glu Lys Leu Ala Ile Leu Asn Phe Gly
 500 505 510

Thr Leu Met Pro Glu Ala Ala Lys Val Ala Glu Ser Leu Asn Ala Thr
 515 520 525

Leu Val Asp Met Arg Phe Val Lys Pro Leu Asp Glu Ala Leu Ile Leu
 530 535 540

Glu Met Ala Ala Ser His Glu Ala Leu Val Thr Val Glu Glu Asn Ala
 545 550 555 560

Ile Met Gly Gly Ala Gly Ser Gly Val Asn Glu Val Leu Met Ala His
 565 570 575

Arg Lys Pro Val Pro Val Leu Asn Ile Gly Leu Pro Asp Phe Phe Ile
 580 585 590

Pro Gln Gly Thr Gln Glu Glu Met Arg Ala Glu Leu Gly Leu Asp Ala
 595 600 605

Ala Gly Met Glu Ala Lys Ile Lys Ala Trp Leu Ala
 610 615 620

特平 1 1 - 0 3 5 7 3 9

【0254】

<210> 2

<211> 299

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 2

Met Asp Phe Pro Gln Gln Leu Glu Ala Cys Val Lys Gln Ala Asn Gln

1

5

10

15

Ala Leu Ser Arg Phe Ile Ala Pro Leu Pro Phe Gln Asn Thr Pro Val

20

25

30

Val Glu Thr Met Gln Tyr Gly Ala Leu Leu Gly Gly Lys Arg Leu Arg

35

40

45

Pro Phe Leu Val Tyr Ala Thr Gly His Met Phe Gly Val Ser Thr Asn

50

55

60

Thr Leu Asp Ala Pro Ala Ala Val Glu Cys Ile His Ala Tyr Ser

65

70

75

80

Leu Ile His Asp Asp Leu Pro Ala Met Asp Asp Asp Asp Leu Arg Arg

85

90

95

Gly Leu Pro Thr Cys His Val Lys Phe Gly Glu Ala Asn Ala Ile Leu

100

105

110

Ala Gly Asp Ala Leu Gln Thr Leu Ala Phe Ser Ile Leu Ser Asp Ala

115 120 125

Asp Met Pro Glu Val Ser Asp Arg Asp Arg Ile Ser Met Ile Ser Glu

130 135 140

Leu Ala Ser Ala Ser Gly Ile Ala Gly Met Cys Gly Gly Gln Ala Leu

145 150 155 160

Asp Leu Asp Ala Glu Gly Lys His Val Pro Leu Asp Ala Leu Glu Arg

165 170 175

Ile His Arg His Lys Thr Gly Ala Leu Ile Arg Ala Ala Val Arg Leu

180 185 190

Gly Ala Leu Ser Ala Gly Asp Lys Gly Arg Arg Ala Leu Pro Val Leu

195 200 205

Asp Lys Tyr Ala Glu Ser Ile Gly Leu Ala Phe Gln Val Gln Asp Asp

210 215 220

Ile Leu Asp Val Val Gly Asp Thr Ala Thr Leu Gly Lys Arg Gln Gly

225 230 235 240

Ala Asp Gln Gln Leu Gly Lys Ser Thr Tyr Pro Ala Leu Leu Gly Leu

245 250 255

Glu Gln Ala Arg Lys Lys Ala Arg Asp Leu Ile Asp Asp Ala Arg Gln

特平 1 1 - 0 3 5 7 3 9

260

265

270

Ser Leu Lys Gln Leu Ala Glu Gln Ser Leu Asp Thr Ser Ala Leu Glu

275

280

285

Ala Leu Ala Asp Tyr Ile Ile Gln Arg Asn Lys

290

295

【0 2 5 5】

<210> 3

<211> 80

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 3

Met Pro Lys Lys Asn Glu Ala Pro Ala Ser Phe Glu Lys Ala Leu Ser

1

5

10

15

Glu Leu Glu Gln Ile Val Thr Arg Leu Glu Ser Gly Asp Leu Pro Leu

20

25

30

Glu Glu Ala Leu Asn Glu Phe Glu Arg Gly Val Gln Leu Ala Arg Gln

35

40

45

Gly Gln Ala Lys Leu Gln Gln Ala Glu Gln Arg Val Gln Ile Leu Leu

50

55

60

Ser Asp Asn Glu Asp Ala Ser Leu Thr Pr Phe Thr Pro Asp Asn Glu

65

70

75

80

[0256]

<210> 4

<211> 348

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 4

Val Thr Gly Val Asn Glu Cys Ser Arg Ser Thr Cys Asn Leu Lys Tyr

1

5

10

15

Asp Glu Tyr Ser Arg Ser Gly Ser Met Gln Tyr Asn Pro Leu Gly Lys

20

25

30

Thr Asp Leu Arg Val Ser Arg Leu Cys Leu Gly Cys Met Thr Phe Gly

35

40

45

Glu Pro Asp Arg Gly Asn His Ala Trp Thr Leu Pro Glu Glu Ser Ser

50

55

60

Arg Pro Ile Ile Lys Arg Ala Leu Glu Gly Gly Ile Asn Phe Phe Asp

65

70

75

80

Thr Ala Asn Ser Tyr Ser Asp Gly Ser Ser Glu Glu Ile Val Gly Arg

85

90

95

Ala Leu Arg Asp Phe Ala Arg Arg Glu Asp Val Val Val Ala Thr Lys

特平 1 1 - 0 3 5 7 3 9

100

105

110

Val Phe His Arg Val Gly Asp Leu Pro Glu Gly Leu Ser Arg Ala Gln

115

120

125

Ile Leu Arg Ser Ile Asp Asp Ser Leu Arg Arg Leu Gly Met Asp Tyr

130

135

140

Val Asp Ile Leu Gln Ile His Arg Trp Asp Tyr Asn Thr Pro Ile Glu

145

150

155

160

Glu Thr Leu Glu Ala Leu Asn Asp Val Val Lys Ala Gly Lys Ala Arg

165

170

175

Tyr Ile Gly Ala Ser Ser Met His Ala Ser Gln Phe Ala Gln Ala Leu

180

185

190

Glu Leu Gln Lys Gln His Gly Trp Ala Gln Phe Val Ser Met Gln Asp

195

200

205

His Tyr Asn Leu Ile Tyr Arg Glu Glu Glu Arg Glu Met Leu Pro Leu

210

215

220

Cys Tyr Gln Glu Gly Val Ala Val Ile Pro Trp Ser Pro Leu Ala Arg

225

230

235

240

Gly Arg Leu Thr Arg Pro Trp Gly Glu Thr Thr Ala Arg Leu Val Ser

245

250

255

特平 1 1 - 0 3 5 7 3 9

Asp Glu Val Gly Lys Asn Leu Tyr Lys Glu Ser Asp Glu Asn Asp Ala

260

265

270

Gln Ile Ala Glu Arg Leu Thr Gly Val Ser Glu Glu Leu Gly Ala Thr

275

280

285

Arg Ala Gln Val Ala Leu Ala Trp Leu Leu Ser Lys Pro Gly Ile Ala

290

295

300

Ala Pro Ile Ile Gly Thr Ser Arg Glu Glu Gln Leu Asp Glu Leu Leu

305

310

315

320

Asn Ala Val Asp Ile Thr Leu Lys Pro Glu Gln Ile Ala Glu Leu Glu

325

330

335

Thr Pro Tyr Lys Pro His Pro Val Val Gly Phe Lys

340

345

【0257】

<210> 5

<211> 398

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 5

Met Lys Gln Leu Thr Ile Leu Gly Ser Thr Gly Ser Ile Gly Cys Ser

1

5

10

15

特平 1 1 - 0 3 5 7 3 9

Thr Leu Asp Val Val Arg His Asn Pro Glu His Phe Arg Val Val Ala

20 25 30

Leu Val Ala Gly Lys Asn Val Thr Arg Met Val Glu Gln Cys Leu Glu

35 40 45

Phe Ser Pro Arg Tyr Ala Val Met Asp Asp Glu Ala Ser Ala Lys Leu

50 55 60

Leu Lys Thr Met Leu Gln Gln Gln Gly Ser Arg Thr Glu Val Leu Ser

65 70 75 80

Gly Gln Gln Ala Ala Cys Asp Met Ala Ala Leu Glu Asp Val Asp Gln

85 90 95

Val Met Ala Ala Ile Val Gly Ala Ala Gly Leu Leu Pro Thr Leu Ala

100 105 110

Ala Ile Arg Ala Gly Lys Thr Ile Leu Leu Ala Asn Lys Glu Ser Leu

115 120 125

Val Thr Cys Gly Arg Leu Phe Met Asp Ala Val Lys Gln Ser Lys Ala

130 135 140

Gln Leu Leu Pro Val Asp Ser Glu His Asn Ala Ile Phe Gln Ser Leu

145 150 155 160

Pro Gln Pro Ile Gln His Asn Leu Gly Tyr Ala Asp Leu Glu Gln Asn

165 170 175

Gly Val Val Ser Ile Leu Leu Thr Gly Ser Gly Gly Pro Phe Arg Glu

180 185 190

Thr Pro Leu Arg Asp Leu Ala Thr Met Thr Pro Asp Gln Ala Cys Arg

195 200 205

His Pro Asn Trp Ser Met Gly Arg Lys Ile Ser Val Asp Ser Ala Thr

210 215 220

Met Met Asn Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Glu Ala Arg Trp Leu Phe Asn

225 230 235 240

Ala Ser Ala Ser Gln Met Glu Val Leu Ile His Pro Gln Ser Val Ile

245 250 255

His Ser Met Val Arg Tyr Gln Asp Gly Ser Val Leu Ala Gln Leu Gly

260 265 270

Glu Pro Asp Met Val Arg Gln Leu Pro Thr Pro Trp Ala Trp Pro Asn

275 280 285

Arg Val Asn Ser Gly Val Lys Pro Leu Asp Phe Cys Lys Leu Ser Ala

290 295 300

Leu Thr Phe Ala Ala Pro Asp Tyr Asp Arg Tyr Pro Cys Leu Lys Leu

305 310 315 320

Ala Met Glu Ala Phe Glu Gln Gly Gln Ala Ala Thr Thr Ala Leu Asn

特平 1 1 - 0 3 5 7 3 9

325

330

335

Ala Ala Asn Glu Ile Thr Val Ala Ala Phe Leu Ala Gln Gln Ile Arg

340

345

350

Phe Thr Asp Ile Ala Ala Leu Asn Leu Ser Val Leu Glu Lys Met Asp

355

360

365

Met Arg Glu Pro Gln Cys Val Asp Asp Val Leu Ser Val Asp Ala Asn

370

375

380

Ala Arg Glu Val Ala Arg Lys Glu Val Met Arg Leu Ala Ser

385

390

395

【0258】

<210> 6

<211> 1860

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1860)

<400> 6

atg agt ttt gat att gcc aaa tac ccg acc ctg gca ctg gtc gac tcc 48

Met Ser Phe Asp Ile Ala Lys Tyr Pr Thr Leu Ala Leu Val Asp Ser

特平11-035739

1 5 10 15

acc cag gag tta cga ctg ttg ccg aaa gag agt tta ccg aaa ctc tgc 96

Thr Gln Glu Leu Arg Leu Leu Pro Lys Glu Ser Leu Pro Lys Leu Cys

20 25 30

gac gaa ctg cgc cgc tat tta ctc gac agc gtg agc cgt tcc agc ggg 144

Asp Glu Leu Arg Arg Tyr Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Ser Ser Gly

35 40 45

cac ttc gcc tcc ggg ctg ggc acg gtc gaa ctg acc gtg gcg ctg cac 192

His Phe Ala Ser Gly Leu Gly Thr Val Glu Leu Thr Val Ala Leu His

50 55 60

tat gtc tac aac acc ccg ttt gac caa ttg att tgg gat gtg ggg cat 240

Tyr Val Tyr Asn Thr Pro Phe Asp Gln Leu Ile Trp Asp Val Gly His

65 70 75 80

cag gct tat ccg cat aaa att ttg acc gga cgc cgc gac aaa atc ggc 288

Gln Ala Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Lys Ile Gly

85 90 95

acc atc cgt cag aaa ggc ggt ctg cac ccg ttc ccg tgg cgc ggc gaa 336

特平 1 1 - 0 3 5 7 3 9

Thr Ile Arg Gln Lys Gly Gly Leu His Pro Phe Pro Trp Arg Gly Glu

100 105 110

agc gaa tat gac gta tta agc gtc ggg cat tca tca acc tcc atc agt 384

Ser Glu Tyr Asp Val Leu Ser Val Gly His Ser Ser Thr Ser Ile Ser

115 120 125

gcc gga att ggt att gcg gtt gct gcc gaa aaa gaa ggc aaa aat cgc 432

Ala Gly Ile Gly Ile Ala Val Ala Ala Glu Lys Glu Gly Lys Asn Arg

130 135 140

cgc acc gtc tgt gtc att ggc gat ggc gcg att acc gca ggc atg gcg 480

Arg Thr Val Cys Val Ile Gly Asp Gly Ala Ile Thr Ala Gly Met Ala

145 150 155 160

ttt gaa gcg atg aat cac gcg ggc gat atc cgt cct gat atg ctg gtg 528

Phe Glu Ala Met Asn His Ala Gly Asp Ile Arg Pro Asp Met Leu Val

165 170 175

att ctc aac gac aat gaa atg tcg att tcc gaa aat gtc ggc gcg ctc 576

Ile Leu Asn Asp Asn Glu Met Ser Ile Ser Glu Asn Val Gly Ala Leu

180 185 190

aac aac cat ctg gca cag ctg ctt tcc ggt aag ctt tac tct tca ctg 624

Asn Asn His Leu Ala Gln Leu Leu Ser Gly Lys Leu Tyr Ser Ser Leu

195 200 205

cgc gaa ggc ggg aaa aaa gtt ttc tct ggc gtg ccg cca att aaa gag 672

Arg Glu Gly Gly Lys Lys Val Phe Ser Gly Val Pro Pro Ile Lys Glu

210 215 220

ctg ctc aaa cgc acc gaa gaa cat att aaa ggc atg gta gtg cct ggc 720

Leu Leu Lys Arg Thr Glu Glu His Ile Lys Gly Met Val Val Pro Gly

225 230 235 240

acg ttg ttt gaa gag ctg ggc ttt aac tac atc ggc ccg gtg gac ggt 768

Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Asn Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly

245 250 255

cac gat gtg ctg ggg ctt atc acc acg cta aag aac atg cgc gac ctg 816

His Asp Val Leu Gly Leu Ile Thr Thr Leu Lys Asn Met Arg Asp Leu

260 265 270

aaa ggc ccg cag ttc ctg cat atc atg acc aaa aaa ggt cgt ggt tat 864

Lys Gly Pro Gln Phe Leu His Ile Met Thr Lys Lys Gly Arg Gly Tyr

275 280 285

特平1 1 - 0 3 5 7 3 9

gaa ccg gca gaa aaa gac ccg atc act ttc cac gcc gtg cct aaa ttt 912

Glu Pro Ala Glu Lys Asp Pro Ile Thr Phe His Ala Val Pro Lys Phe

290 295 300

gat ccc tcc agc ggt tgt ttg ccg aaa agt agc ggc ggt ttg ccg agc 960

Asp Pro Ser Ser Gly Cys Leu Pro Lys Ser Ser Gly Gly Leu Pro Ser

305 310 315 320

tat tca aaa atc ttt ggc gac tgg ttg tgc gaa acg gca gcg aaa gac 1008

Tyr Ser Lys Ile Phe Gly Asp Trp Leu Cys Glu Thr Ala Ala Lys Asp

325 330 335

aac aag ctg atg gcg att act ccg gcg atg cgt gaa ggt tcc ggc atg 1056

Asn Lys Leu Met Ala Ile Thr Pro Ala Met Arg Glu Gly Ser Gly Met

340 345 350

gtc gag ttt tca cgt aaa ttc ccg gat cgc tac ttc gac gtg gca att 1104

Val Glu Phe Ser Arg Lys Phe Pro Asp Arg Tyr Phe Asp Val Ala Ile

355 360 365

gcc gag caa cac gcg gtg acc ttt gct gcg ggt ctg gcg att ggt ggg 1152

Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Ile Gly Gly

370 375 380

tac aaa ccc att gtc gcg att tac tcc act ttc ctg caa cgc gcc tat 1200

Tyr Lys Pro Ile Val Ala Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Ala Tyr
385 390 395 400

gat cag gtg ctg cat gac gtg gcg att caa aag ctt ccg gtc ctg ttc 1248

Asp Gln Val Leu His Asp Val Ala Ile Gln Lys Leu Pro Val Leu Phe
405 410 415

gcc atc gac cgc gcg ggc att gtt ggt gct gac ggt caa acc cat cag 1296

Ala Ile Asp Arg Ala Gly Ile Val Gly Ala Asp Gly Gln Thr His Gln
420 425 430

ggg gct ttt gat ctc tct tac ctg cgc tgc ata ccg gaa atg gtc att 1344

Gly Ala Phe Asp Leu Ser Tyr Leu Arg Cys Ile Pro Glu Met Val Ile
435 440 445

atg acc ccg agc gat gaa aac gaa tgt cgc cag atg ctc tat acc ggc 1392

Met Thr Pro Ser Asp Glu Asn Glu Cys Arg Gln Met Leu Tyr Thr Gly
450 455 460

tat cac tat aac gat ggc ccg tca gcg gtg cgc tac ccg cgt ggc aac 1440

Tyr His Tyr Asn Asp Gly Pro Ser Ala Val Arg Tyr Pro Arg Gly Asn

特平 1 1 - 0 3 5 7 3 9

465

470

475

480

gct gtc ggc gtg gaa ctg acg ccg ctg gaa aaa cta cca att ggc aaa 1488

Ala Val Gly Val Glu Leu Thr Pro Leu Glu Lys Leu Pro Ile Gly Lys

485

490

495

ggc att gtg aag cgt cgt ggc gag aaa ctg gct atc ctt aac ttt ggt 1536

Gly Ile Val Lys Arg Arg Gly Glu Lys Leu Ala Ile Leu Asn Phe Gly

500

505

510

acg ctg atg cca gaa gct gct gaa tcg ctg aac gcc acg 1584

Thr Leu Met Pro Glu Ala Ala Lys Val Ala Glu Ser Leu Asn Ala Thr

515

520

525

ctg gtc gat atg cgt ttt gtg aaa ccg ctt gat gaa gct tta att ctg 1632

Leu Val Asp Met Arg Phe Val Lys Pro Leu Asp Glu Ala Leu Ile Leu

530

535

540

gaa atg gcc gcc agc cat gaa gct ctg gtc acc gta gaa gaa aac gcc 1680

Glu Met Ala Ala Ser His Glu Ala Leu Val Thr Val Glu Glu Asn Ala

545

550

555

560

att atg ggc ggc gca ggc agc ggc gtg aac gaa gtg ctg atg gcc cat 1728

特平 1 1 - 0 3 5 7 3 9

Ile Met Gly Gly Ala Gly Ser Gly Val Asn Glu Val Leu Met Ala His

565

570

575

cgt aaa cca gta ccc gtg ctg aac att ggc ctg ccg gac ttc ttt att 1776

Arg Lys Pro Val Pro Val Leu Asn Ile Gly Leu Pro Asp Phe Phe Ile

580

585

590

ccg caa gga act cag gaa gaa atg cgc gcc gaa ctc ggc ctc gat gcc 1824

Pro Gln Gly Thr Gln Glu Glu Met Arg Ala Glu Leu Gly Leu Asp Ala

595

600

605

gct ggt atg gaa gcc aaa atc aag gcc tgg ctg gca 1860

Ala Gly Met Glu Ala Lys Ile Lys Ala Trp Leu Ala

610

615

620

[0 2 5 9]

<210> 7

<211> 897

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(897)

特平 1 1 - 0 3 5 7 3 9

<400> 7

atg gac ttt ccg cag caa ctc gaa gcc tgc gtt aag cag gcc aac cag 48

Met Asp Phe Pro Gln Gln Leu Glu Ala Cys Val Lys Gln Ala Asn Gln

1

5

10

15

gcg ctg agc cgt ttt atc gcc cca ctg ccc ttt cag aac act ccc gtg 96

Ala Leu Ser Arg Phe Ile Ala Pro Leu Pro Phe Gln Asn Thr Pro Val

20

25

30

gtc gaa acc atg cag tat ggc gca tta tta ggt ggt aag cgc ctg cga 144

Val Glu Thr Met Gln Tyr Gly Ala Leu Leu Gly Gly Lys Arg Leu Arg

35

40

45

cct ttc ctg gtt tat gcc acc ggt cat atg ttc ggc gtt agc aca aac 192

Pro Phe Leu Val Tyr Ala Thr Gly His Met Phe Gly Val Ser Thr Asn

50

55

60

acg ctg gac gca ccc gct gcc gcc gtt gag tgt atc cac gct tac tca 240

Thr Leu Asp Ala Pro Ala Ala Val Glu Cys Ile His Ala Tyr Ser

65

70

75

80

tta att cat gat gat tta ccg gca atg gat gat gac gat ctg cgt cgc 288

Leu Ile His Asp Asp Leu Pro Ala Met Asp Asp Asp Asp Leu Arg Arg

85

90

95

ggt ttg cca acc tgc cat gtg aag ttt ggc gaa gca aac gcg att ctc 336

Gly Leu Pro Thr Cys His Val Lys Phe Gly Glu Ala Asn Ala Ile Leu

100

105

110

gct ggc gac gct tta caa acg ctg gcg ttc tcg att tta agc gat gcc 384

Ala Gly Asp Ala Leu Gln Thr Leu Ala Phe Ser Ile Leu Ser Asp Ala

115

120

125

gat atg ccg gaa gtg tcg gac cgc gac aga att tcg atg att tct gaa 432

Asp Met Pro Glu Val Ser Asp Arg Asp Arg Ile Ser Met Ile Ser Glu

130

135

140

ctg gcg agc gcc agt ggt att gcc gga atg tgc ggt ggt cag gca tta 480

Leu Ala Ser Ala Ser Gly Ile Ala Gly Met Cys Gly Gly Gln Ala Leu

145

150

155

160

gat tta gac gcg gaa ggc aaa cac gta cct ctg gac gcg ctt gag cgt 528

Asp Leu Asp Ala Glu Gly Lys His Val Pro Leu Asp Ala Leu Glu Arg

165

170

175

att cat cgt cat aaa acc ggc gca ttg att cgc gcc gcc gtt cgc ctt 576

特平 1 1 - 0 3 5 7 3 9

Ile His Arg His Lys Thr Gly Ala Leu Ile Arg Ala Ala Val Arg Leu

180

185

190

ggt gca tta agc gcc gga gat aaa gga cgt cgt gct ctg ccg gta ctc 624

Gly Ala Leu Ser Ala Gly Asp Lys Gly Arg Arg Ala Leu Pro Val Leu

195

200

205

gac aag tat gca gag agc atc ggc ctt gcc ttc cag gtt cag gat gac 672

Asp Lys Tyr Ala Glu Ser Ile Gly Leu Ala Phe Gln Val Gln Asp Asp

210

215

220

atc ctg gat gtg gtg gga gat act gca acg ttg gga aaa cgc cag ggt 720

Ile Leu Asp Val Val Gly Asp Thr Ala Thr Leu Gly Lys Arg Gln Gly

225

230

235

240

gcc gac cag caa ctt ggt aaa agt acc tac cct gca ctt ctg ggt ctt 768

Ala Asp Gln Gln Leu Gly Lys Ser Thr Tyr Pro Ala Leu Leu Gly Leu

245

250

255

gag caa gcc cgg aag aaa gcc cgg gat ctg atc gac gat gcc cgt cag 816

Glu Gln Ala Arg Lys Lys Ala Arg Asp Leu Ile Asp Asp Ala Arg Gln

260

265

270

tcg ctg aaa caa ctg gct gaa cag tca ctc gat acc tcg gca ctg gaa 864

Ser Leu Lys Gln Leu Ala Glu Gln Ser Leu Asp Thr Ser Ala Leu Glu

275

280

285

gcg cta gcg gac tac atc atc cag cgt aat aaa

897

Ala Leu Ala Asp Tyr Ile Ile Gln Arg Asn Lys

290

295

[0 2 6 0]

<210> 8

<211> 240

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(240)

<400> 8

atg ccg aag aaa aat gag gcg ccc gcc agc ttt gaa aag gcg ctg agc 48

Met Pro Lys Lys Asn Glu Ala Pro Ala Ser Phe Glu Lys Ala Leu Ser

1

5

10

15

gag ctg gaa cag att gta acc cgt ctg gaa agt ggc gac ctg ccg ctg 96

Glu Leu Glu Gln Ile Val Thr Arg Leu Glu Ser Gly Asp Leu Pro Leu

特平 1 1 - 0 3 5 7 3 9

20

25

30

gaa gag gcg ctg aac gag ttc gaa cgc ggc gtg cag ctg gca cgt cag 144

Glu Glu Ala Leu Asn Glu Phe Glu Arg Gly Val Gln Leu Ala Arg Gln

35

40

45

ggg cag gcc aaa tta caa caa gcc gaa cag cgc gta caa att ctg ctg 192

Gly Gln Ala Lys Leu Gln Gln Ala Glu Gln Arg Val Gln Ile Leu Leu

50

55

60

tct gac aat gaa gac gcc tct cta acc cct ttt aca ccg gac aat gag 240

Ser Asp Asn Glu Asp Ala Ser Leu Thr Pro Phe Thr Pro Asp Asn Glu

65

70

75

80

【0 2 6 1】

<210> 9

<211> 1044

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1044)

<400> 9

gtg act ggg gtg aac gaa tgc agc cgc agc aca tgc aac ttg aag tat 48

Val Thr Gly Val Asn Glu Cys Ser Arg Ser Thr Cys Asn Leu Lys Tyr

1

5

10

15

gac gag tat agc agg agt ggc agc atg caa tac aac ccc tta gga aaa 96

Asp Glu Tyr Ser Arg Ser Gly Ser Met Gln Tyr Asn Pro Leu Gly Lys

20

25

30

acc gac ctt cgc gtt tcc cga ctt tgc ctc ggc tgt atg acc ttt ggc 144

Thr Asp Leu Arg Val Ser Arg Leu Cys Leu Gly Cys Met Thr Phe Gly

35

40

45

gag cca gat cgc ggt aat cac gca tgg aca ctg ccg gaa gaa agc agc 192

Glu Pro Asp Arg Gly Asn His Ala Trp Thr Leu Pro Glu Glu Ser Ser

50

55

60

cgt ccc ata att aaa cgt gca ctg gaa ggc ggc ata aat ttc ttt gat 240

Arg Pro Ile Ile Lys Arg Ala Leu Glu Gly Gly Ile Asn Phe Phe Asp

65

70

75

80

acc gcc aac agt tat tct gac ggc agc agc gaa gag atc gtc ggt cgc 288

Thr Ala Asn Ser Tyr Ser Asp Gly Ser Ser Glu Glu Ile Val Gly Arg

85

90

95

特平 1 1 - 0 3 5 7 3 9

gca ctg cgg gat ttc gcc cgt cgt gaa gac gtc gtt gcg acc aaa 336

Ala Leu Arg Asp Phe Ala Arg Arg Glu Asp Val Val Val Ala Thr Lys

100 105 110

gtg ttc cat cgc gtt ggt gat tta ccg gaa gga tta tcc cgt gcg caa 384

Val Phe His Arg Val Gly Asp Leu Pro Glu Gly Leu Ser Arg Ala Gln

115 120 125

att ttg cgc tct atc gac gac agc ctg cga cgt ctc ggc atg gat tat 432

Ile Leu Arg Ser Ile Asp Asp Ser Leu Arg Arg Leu Gly Met Asp Tyr

130 135 140

gtc gat atc ctg caa att cat cgc tgg gat tac aac acg ccg atc gaa 480

Val Asp Ile Leu Gln Ile His Arg Trp Asp Tyr Asn Thr Pro Ile Glu

145 150 155 160

gag acg ctg gaa gcc ctc aac gac gtg gta aaa gcc ggg aaa gcg cgt 528

Glu Thr Leu Glu Ala Leu Asn Asp Val Val Lys Ala Gly Lys Ala Arg

165 170 175

tat atc ggc gcg tca tca atg cac gct tcg cag ttt gct cag gca ctg 576

Tyr Ile Gly Ala Ser Ser Met His Ala Ser Gln Phe Ala Gln Ala Leu

180

185

190

gaa ctc caa aaa cag cac ggc tgg gcg cag ttt gtc agt atg cag gat 624

Glu Leu Gln Lys Gln His Gly Trp Ala Gln Phe Val Ser Met Gln Asp

195

200

205

cac tac aat ctg att tat cgt gaa gaa gag cgc gag atg cta cca ctg 672

His Tyr Asn Leu Ile Tyr Arg Glu Glu Glu Arg Glu Met Leu Pro Leu

210

215

220

tgt tat cag gag ggc gtg gcg gta att cca tgg agc ccg ctg gca agg 720

Cys Tyr Gln Glu Gly Val Ala Val Ile Pro Trp Ser Pro Leu Ala Arg

225

230

235

240

ggc cgt ctg acg cgt ccg tgg gga gaa act acc gca cga ctg gtg tct 768

Gly Arg Leu Thr Arg Pro Trp Gly Glu Thr Thr Ala Arg Leu Val Ser

245

250

255

gat gag gtg ggg aaa aat ctc tat aaa gaa agc gat gaa aat gac gcg 816

Asp Glu Val Gly Lys Asn Leu Tyr Lys Glu Ser Asp Glu Asn Asp Ala

260

265

270

cag atc gca gag cgg tta aca ggc gtc agt gaa gaa ctg ggg gcg aca 864

特平 1 1 - 0 3 5 7 3 9

Gln Ile Ala Glu Arg Leu Thr Gly Val Ser Glu Glu Leu Gly Ala Thr

275

280

285

cga gca caa gtt gcg ctg gcc tgg ttg ttg agt aaa ccg ggc att gcc 912

Arg Ala Gln Val Ala Leu Ala Trp Leu Leu Ser Lys Pro Gly Ile Ala

290

295

300

gca ccg att atc gga act tcg cgc gaa gaa cag ctt gat gag cta ttg 960

Ala Pro Ile Ile Gly Thr Ser Arg Glu Glu Gln Leu Asp Glu Leu Leu

305

310

315

320

aac gcg gtg gat atc act ttg aag ccg gaa cag att gcc gaa ctg gaa 1008

Asn Ala Val Asp Ile Thr Leu Lys Pro Glu Gln Ile Ala Glu Leu Glu

325

330

335

acg ccg tat aaa ccg cat cct gtc gta gga ttt aaa 1044

Thr Pro Tyr Lys Pro His Pro Val Val Gly Phe Lys

340

345

【0 2 6 2】

<210> 10

<211> 1194

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1194)

<400> 10

atg aag caa ctc acc att ctg ggc tcg acc ggc tcg att ggt tgc agc 48

Met Lys Gln Leu Thr Ile Leu Gly Ser Thr Gly Ser Ile Gly Cys Ser

1

5

10

15

acg ctg gac gtg gtg cgc cat aat ccc gaa cac ttc cgc gta gtt gcg 96

Thr Leu Asp Val Val Arg His Asn Pro Glu His Phe Arg Val Val Ala

20

25

30

ctg gtg gca ggc aaa aat gtc act cgc atg gta gaa cag tgc ctg gaa 144

Leu Val Ala Gly Lys Asn Val Thr Arg Met Val Glu Gln Cys Leu Glu

35

40

45

ttc tct ccc cgc tat gcc gta atg gac gat gaa gcg agt gcg aaa ctt 192

Phe Ser Pro Arg Tyr Ala Val Met Asp Asp Glu Ala Ser Ala Lys Leu

50

55

60

ctt aaa acg atg cta cag caa cag ggt agc cgc acc gaa gtc tta agt 240

Leu Lys Thr Met Leu Gln Gln Gly Ser Arg Thr Glu Val Leu Ser

特平 1 1 - 0 3 5 7 3 9

65

70

75

80

ggg caa caa gcc gct tgc gat atg gca gcg ctt gag gat gtt gat cag 288

Gly Gln Gln Ala Ala Cys Asp Met Ala Ala Leu Glu Asp Val Asp Gln

85

90

95

gtg atg gca gcc att gtt ggc gct gct ggg ctg tta cct acg ctt gct 336

Val Met Ala Ala Ile Val Gly Ala Ala Gly Leu Leu Pro Thr Leu Ala

100

105

110

gcg atc cgc gcg ggt aaa acc att ttg ctg gcc aat aaa gaa tca ctg 384

Ala Ile Arg Ala Gly Lys Thr Ile Leu Leu Ala Asn Lys Glu Ser Leu

115

120

125

gtt acc tgc gga cgt ctg ttt atg gac gcc gta aag cag agc aaa gcg 432

Val Thr Cys Gly Arg Leu Phe Met Asp Ala Val Lys Gln Ser Lys Ala

130

135

140

caa ttg tta ccg gtc gat agc gaa cat aac gcc att ttt cag agt tta 480

Gln Leu Leu Pro Val Asp Ser Glu His Asn Ala Ile Phe Gln Ser Leu

145

150

155

160

ccg caa cct atc cag cat aat ctg gga tac gct gac ctt gag caa aat 528

Pro Gln Pro Ile Gln His Asn Leu Gly Tyr Ala Asp Leu Glu Gln Asn

165 170 175

ggc gtg gtg tcc att tta ctt acc ggg tct ggt ggc cct ttc cgt gag 576

Gly Val Val Ser Ile Leu Leu Thr Gly Ser Gly Gly Pro Phe Arg Glu

180 185 190

acg cca ttg cgc gat ttg gca aca atg acg ccg gat caa gcc tgc cgt 624

Thr Pro Leu Arg Asp Leu Ala Thr Met Thr Pro Asp Gln Ala Cys Arg

195 200 205

cat ccg aac tgg tcg atg ggg cgt aaa att tct gtc gat tcg gct acc 672

His Pro Asn Trp Ser Met Gly Arg Lys Ile Ser Val Asp Ser Ala Thr

210 215 220

atg atg aac aaa ggt ctg gaa tac att gaa gcg cgt tgg ctg ttt aac 720

Met Met Asn Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Glu Ala Arg Trp Leu Phe Asn

225 230 235 240

gcc agc gcc agc cag atg gaa gtg ctg att cac ccg cag tca gtg att 768

Ala Ser Ala Ser Gln Met Glu Val Leu Ile His Pro Gln Ser Val Ile

245 250 255

cac tca atg gtg cgc tat cag gac ggc agt gtt ctg gcg cag ctg ggg 816¥

特平 1 1 - 0 3 5 7 3 9

His Ser Met Val Arg Tyr Gln Asp Gly Ser Val Leu Ala Gln Leu Gly

260

265

270

gaa ccg gat atg gta cgc caa ttg ccc aca cca tgg gca tgg ccg aat 864

Glu Pro Asp Met Val Arg Gln Leu Pro Thr Pro Trp Ala Trp Pro Asn

275

280

285

cgc gtg aac tct ggc gtg aag ccg ctc gat ttt tgc aaa cta agt gcg 912

Arg Val Asn Ser Gly Val Lys Pro Leu Asp Phe Cys Lys Leu Ser Ala

290

295

300

ttg aca ttt gcc gca ccg gat tat gat cgt tat cca tgc ctg aaa ctg 960

Leu Thr Phe Ala Ala Pro Asp Tyr Asp Arg Tyr Pro Cys Leu Lys Leu

305

310

315

320

gcg atg gag gcg ttc gaa caa ggc cag gca gcg acg aca gca ttg aat 1008

Ala Met Glu Ala Phe Glu Gln Gly Gln Ala Ala Thr Thr Ala Leu Asn

325

330

335

gcc gca aac gaa atc acc gtt gct gct ttt ctt gcg caa caa atc cgc 1056

Ala Ala Asn Glu Ile Thr Val Ala Ala Phe Leu Ala Gln Gln Ile Arg

340

345

350

ttt acg gat atc gct gcg ttg aat tta tcc gta ctg gaa aaa atg gat 1104

特平 1 1 - 0 3 5 7 3 9

Phe Thr Asp Ile Ala Ala Leu Asn Leu Ser Val Leu Glu Lys Met Asp

355

360

365

atg cgc gaa cca caa tgt gtg gac gat gtg tta tct gtt gat gcg aac 1152

Met Arg Glu Pro Gln Cys Val Asp Asp Val Leu Ser Val Asp Ala Asn

370

375

380

gcg cgt gaa gtc gcc aga aaa gag gtg atg cgt ctc gca agc

1194

Ala Arg Glu Val Ala Arg Lys Glu Val Met Arg Leu Ala Ser

385

390

395

【0 2 6 3】

<210> 11

<211> 4390

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (208)..(447)

<220>

<221> CDS

<222> (450)..(1346)

特平 1 1 - 0 3 5 7 3 9

<220>

<221> CDS

<222> (1374)..(3233)

<220>

<221> CDS

<222> (3344)..(4390)

<400> 11

atggcggcaa tggttcggtt gcaaggctta agcgacttgt atagggaaaa atacagcagc 60

ccacacccgc ggctgcattc aggccggaa gtataccact aacatcgctt tgctgtgcac 120

atcaccttac cattgcgcgt tatttgctat ttgcctgag tccgttacca tgacggggcg 180

aaaaatattg agagtcagac attcatt atg ccg aag aaa aat gag gcg ccc gcc 234

Met Pro Lys Lys Asn Glu Ala Pro Ala

1

5

agc ttt gaa aag gcg ctg agc gag ctg gaa cag att gta acc cgt ctg 282

Ser Phe Glu Lys Ala Leu Ser Glu Leu Glu Gln Ile Val Thr Arg Leu

10

15

20

25

gaa agt ggc gac ctg ccg ctg gaa gag gcg ctg aac gag ttc gaa cgc 330

特平 1 1 - 0 3 5 7 3 9

Glu Ser Gly Asp Leu Pro Leu Glu Glu Ala Leu Asn Glu Phe Glu Arg

30 35 40

ggc gtg cag ctg gca cgt cag ggg cag gcc aaa tta caa caa gcc gaa 378

Gly Val Gln Leu Ala Arg Gln Gly Gln Ala Lys Leu Gln Gln Ala Glu

45 50 55

cag cgc gta caa att ctg ctg tct gac aat gaa gac gcc tct cta acc 426

Gln Arg Val Gln Ile Leu Leu Ser Asp Asn Glu Asp Ala Ser Leu Thr

60 65 70

cct ttt aca ccg gac aat gag ta atg gac ttt ccg cag caa ctc gaa 473

Pro Phe Thr Pro Asp Asn Glu Met Asp Phe Pro Gln Gln Leu Glu

75 80 1 5

gcc tgc gtt aag cag gcc aac cag gcg ctg agc cgt ttt atc gcc cca 521

Ala Cys Val Lys Gln Ala Asn Gln Ala Leu Ser Arg Phe Ile Ala Pro

10 15 20

ctg ccc ttt cag aac act ccc gtg gtc gaa acc atg cag tat ggc gca 569

Leu Pro Phe Gln Asn Thr Pr Val Val Glu Thr Met Gln Tyr Gly Ala

25 30 35 40

特平1 1 — 0 3 5 7 3 9

tta tta ggt ggt aag cgc ctg cga cct ttc ctg gtt tat gcc acc ggt 617

Leu Leu Gly Gly Lys Arg Leu Arg Pro Phe Leu Val Tyr Ala Thr Gly

45 50 55

cat atg ttc ggc gtt agc aca aac acg ctg gac gca ccc gct gcc gcc 665

His Met Phe Gly Val Ser Thr Asn Thr Leu Asp Ala Pro Ala Ala Alay

60 65 70

gtt gag tgt atc cac gct tac tca tta att cat gat gat tta ccg gca 713

Val Glu Cys Ile His Ala Tyr Ser Leu Ile His Asp Asp Leu Pro Ala

75 80 85

atg gat gat gac gat ctg cgt cgc ggt ttg cca acc tgc cat gtg aag 761

Met Asp Asp Asp Asp Leu Arg Arg Gly Leu Pro Thr Cys His Val Lys

90 95 100

ttt ggc gaa gca aac gcg att ctc gct ggc gac gct tta caa acg ctg 809

Phe Gly Glu Ala Asn Ala Ile Leu Ala Gly Asp Ala Leu Gln Thr Leu

105 110 115 120

gcg ttc tcg att tta agc gat gcc gat atg ccg gaa gtg tcg gac cgc 857

Ala Phe Ser Ile Leu Ser Asp Ala Asp Met Pro Glu Val Ser Asp Arg

125 130 135

gac aga att tcg atg att tct gaa ctg gcg agc gcc agt ggt att gcc 905

Asp Arg Ile Ser Met Ile Ser Glu Leu Ala Ser Ala Ser Gly Ile Ala
140 145 150

gga atg tgc ggt ggt cag gca tta gat tta gac gcg gaa ggc aaa cac 953

Gly Met Cys Gly Gly Gln Ala Leu Asp Leu Asp Ala Glu Gly Lys His
155 160 165

gta cct ctg gac gcg ctt gag cgt att cat cgt cat aaa acc acc ggc gca 1001

Val Pro Leu Asp Ala Leu Glu Arg Ile His Arg His Lys Thr Gly Ala
170 175 180

ttg att cgc gcc gcc gtt cgc ctt ggt gca tta agc gcc gga gat aaa 1049

Leu Ile Arg Ala Ala Val Arg Leu Gly Ala Leu Ser Ala Gly Asp Lys
185 190 195 200

gga cgt cgt gct ctg ccg gta ctc gac aag tat gca gag agc atc ggc 1097

Gly Arg Arg Ala Leu Pro Val Leu Asp Lys Tyr Ala Glu Ser Ile Gly
205 210 215

ctt gcc ttc cag gtt cag gat gac atc ctg gat gtg gtg gga gat act 1145

Leu Ala Phe Gln Val Gln Asp Asp Ile Leu Asp Val Val Gly Asp Thr

特平 1 1 - 0 3 5 7 3 9

220

225

230

gca acg ttg gga aaa cgc cag ggt gcc gac cag caa ctt ggt aaa agt 1193

Ala Thr Leu Gly Lys Arg Gln Gly Ala Asp Gln Gln Leu Gly Lys Ser

235

240

245

acc tac cct gca ctt ctg ggt ctt gag caa gcc cg^g aag aaa gcc cg^g 1241

Thr Tyr Pro Ala Leu Leu Gly Leu Glu Gln Ala Arg Lys Lys Ala Arg

250

255

260

gat ctg atc gac gat gcc cgt cag tcg ctg aaa caa ctg gct gaa cag 1289

Asp Leu Ile Asp Asp Ala Arg Gln Ser Leu Lys Gln Leu Ala Glu Gln

265

270

275

280

tca ctc gat acc tcg gca ctg gaa gc^g cta gc^g gac tac atc atc cag 1337

Ser Leu Asp Thr Ser Ala Leu Glu Ala Leu Ala Asp Tyr Ile Ile Gln

285

290

295

cgt aat aaa taaaacaataa gtattaatag gcccctg atg agt ttt gat att gcc 1391

Arg Asn Lys

Met Ser Phe Asp Ile Ala

1

5

aaa tac ccg acc ctg gca ctg gtc gac tcc acc cag gag tta cga ctg 1439

特平11-035739

Lys Tyr Pro Thr Leu Ala Leu Val Asp Ser Thr Gln Glu Leu Arg Leu

10 15 20

ttg ccg aaa gag agt tta ccg aaa ctc tgc gac gaa ctg cgc cgc tat 1487

Leu Pro Lys Glu Ser Leu Pro Lys Leu Cys Asp Glu Leu Arg Arg Tyr

25 30 35

tta ctc gac agc gtg agc cgt tcc agc ggg cac ttc gcc tcc ggg ctg 1535

Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Ser Ser Gly His Phe Ala Ser Gly Leu

40 45 50

ggc acg gtc gaa ctg acc gtg gcg ctg cac tat gtc tac aac acc ccg 1583

Gly Thr Val Glu Leu Thr Val Ala Leu His Tyr Val Tyr Asn Thr Pro

55 60 65 70

ttt gac caa ttg att tgg gat gtg ggg cat cag gct tat ccg cat aaa 1631

Phe Asp Gln Leu Ile Trp Asp Val Gly His Gln Ala Tyr Pro His Lys

75 80 85

att ttg acc gga cgc cgc gac aaa atc ggc acc atc cgt cag aaa ggc 1679

Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Lys Ile Gly Thr Ile Arg Gln Lys Gly

90 95 100

ggc ctg cac ccg ttc ccg tgg cgc ggc gaa agc gaa tat gac gta tta 1727

特平 1 1 - 0 3 5 7 3 9

Gly Leu His Pro Phe Pro Trp Arg Gly Glu Ser Glu Tyr Asp Val Leu

105 110 115

agc gtc ggg cat tca tca acc tcc atc agt gcc gga att ggt att gcg 1775

Ser Val Gly His Ser Ser Thr Ser Ile Ser Ala Gly Ile Gly Ile Ala

120 125 130

gtt gct gcc gaa aaa gaa ggc aaa aat cgc cgc acc gtc tgt gtc att 1823

Val Ala Ala Glu Lys Glu Gly Lys Asn Arg Arg Thr Val Cys Val Ile

135 140 145 150

ggc gat ggc gcg att acc gca ggc atg gcg ttt gaa gcg atg aat cac 1871

Gly Asp Gly Ala Ile Thr Ala Gly Met Ala Phe Glu Ala Met Asn His

155 160 165

gcg ggc gat atc cgt cct gat atg ctg gtg att ctc aac gac aat gaa 1919

Ala Gly Asp Ile Arg Pro Asp Met Leu Val Ile Leu Asn Asp Asn Glu

170 175 180

atg tcg att tcc gaa aat gtc ggc gcg ctc aac aac cat ctg gca cag 1967

Met Ser Ile Ser Glu Asn Val Gly Ala Leu Asn Asn His Leu Ala Gln

185 190 195

ctg ctt tcc ggt aag ctt tac tct tca ctg cgc gaa ggc ggg aaa aaa 2015

Leu Leu Ser Gly Lys Leu Tyr Ser Ser Leu Arg Glu Gly Gly Lys Lys

200 205 210

gtt ttc tct ggc gtg ccg cca att aaa gag ctg ctc aaa cgc acc gaa 2063

Val Phe Ser Gly Val Pro Pro Ile Lys Glu Leu Leu Lys Arg Thr Glu

215 220 225 230

gaa cat att aaa ggc atg gta gtg cct ggc acg ttg ttt gaa gag ctg 2111

Glu His Ile Lys Gly Met Val Val Pro Gly Thr Leu Phe Glu Glu Leu

235 240 245

ggc ttt aac tac atc ggc ccg gtg gac ggt cac gat gtg ctg ggg ctt 2159

Gly Phe Asn Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly His Asp Val Leu Gly Leu

250 255 260

atc acc acg cta aag aac atg cgc gac ctg aaa ggc ccg cag ttc ctg 2207

Ile Thr Thr Leu Lys Asn Met Arg Asp Leu Lys Gly Pro Gln Phe Leu

265 270 275

cat atc atg acc aaa aaa ggt cgt ggt tat gaa ccg gca gaa aaa gac 2255

His Ile Met Thr Lys Lys Gly Arg Gly Tyr Glu Pro Ala Glu Lys Asp

280 285 290

特平 1 1 - 0 3 5 7 3 9

ccg atc act ttc cac gcc gtg cct aaa ttt gat ccc tcc agc ggt tgt 2303

Pro Ile Thr Phe His Ala Val Pro Lys Phe Asp Pro Ser Ser Gly Cys

295 300 305 310

ttg ccg aaa agt agc ggc ggt ttg ccg agc tat tca aaa atc ttt ggc 2351

Leu Pro Lys Ser Ser Gly Gly Leu Pro Ser Tyr Ser Lys Ile Phe Gly

315 320 325

gac tgg ttg tgc gaa acg gca gcg aaa gac aac aag ctg atg gcg att 2399

Asp Trp Leu Cys Glu Thr Ala Ala Lys Asp Asn Lys Leu Met Ala Ile

330 335 340

act ccg gcg atg cgt gaa ggt tcc ggc atg gtc gag ttt tca cgt aaa 2447

Thr Pro Ala Met Arg Glu Gly Ser Gly Met Val Glu Phe Ser Arg Lys

345 350 355

ttc ccg gat cgc tac ttc gac gtg gca att gcc gag caa cac gcg gtg 2495

Phe Pro Asp Arg Tyr Phe Asp Val Ala Ile Ala Glu Gln His Ala Val

360 365 370

acc ttt gct gcg ggt ctg gcg att ggt ggg tac aaa ccc att gtc gcg 2543

Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Ile Gly Gly Tyr Lys Pro Ile Val Ala

特平11-035739

375

380

385

390

att tac tcc act ttc ctg caa cgc gcc tat gat cag gtg ctg cat gac 2591

Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Ala Tyr Asp Gln Val Leu His Asp

395

400

405

gtg gcg att caa aag ctt ccg gtc ctg ttc gcc atc gac cgc gcg ggc 2639

Val Ala Ile Gln Lys Leu Pro Val Leu Phe Ala Ile Asp Arg Ala Gly

410

415

420

att gtt ggt gct gac ggt caa acc cat cag ggt gct ttt gat ctc tct 2687

Ile Val Gly Ala Asp Gly Gln Thr His Gln Gly Ala Phe Asp Leu Ser

425

430

435

tac ctg cgc tgc ata ccg gaa atg gtc att atg acc ccg agc gat gaa 2735

Tyr Leu Arg Cys Ile Pro Glu Met Val Ile Met Thr Pro Ser Asp Glu

440

445

450

aac gaa tgt cgc cag atg ctc tat acc ggc tat cac tat aac gat ggc 2783

Asn Glu Cys Arg Gln Met Leu Tyr Thr Gly Tyr His Tyr Asn Asp Gly

455

460

465

470

ccg tca gcg gtg cgc tac ccg cgt ggc aac gcg gtc ggc gtg gaa ctg 2831

特平11-035739

Pro Ser Ala Val Arg Tyr Pro Arg Gly Asn Ala Val Gly Val Glu Leu

475

480

485

acg ccg ctg gaa aaa cta cca att ggc aaa ggc att gtg aag cgt cgt 2879

Thr Pro Leu Glu Lys Leu Pro Ile Gly Lys Gly Ile Val Lys Arg Arg

490

495

500

ggc gag aaa ctg gcg atc ctt aac ttt ggt acg ctg atg cca gaa gcg 2927

Gly Glu Lys Leu Ala Ile Leu Asn Phe Gly Thr Leu Met Pro Glu Ala

505

510

515

gcg aaa gtc gcc gaa tcg ctg aac gcc acg ctg gtc gat atg cgt ttt 2975

Ala Lys Val Ala Glu Ser Leu Asn Ala Thr Leu Val Asp Met Arg Phe

520

525

530

gtg aaa ccg ctt gat gaa gcg tta att ctg gaa atg gcc gcc agc cat 3023

Val Lys Pro Leu Asp Glu Ala Leu Ile Leu Glu Met Ala Ala Ser His

535

540

545

550

gaa gcg ctg gtc acc gta gaa gaa aac gcc att atg ggc ggc gca ggc 3071

Glu Ala Leu Val Thr Val Glu Glu Asn Ala Ile Met Gly Gly Ala Gly

555

560

565

agc ggc gtg aac gaa gtg ctg atg gcc cat cgt aaa cca gta ccc gtg 3119

特平11-035739

Ser Gly Val Asn Glu Val Leu Met Ala His Arg Lys Pro Val Pro Val

570 575 580

ctg aac att ggc ctg ccg gac ttc ttt att ccg caa gga act cag gaa 3167

Leu Asn Ile Gly Leu Pro Asp Phe Phe Ile Pro Gln Gly Thr Gln Glu

585 590 595

gaa atg cgc gcc gaa ctc ggc ctc gat gcc gct ggt atg gaa gcc aaa 3215

Glu Met Arg Ala Glu Leu Gly Leu Asp Ala Ala Gly Met Glu Ala Lys

600 605 610

atc aag gcc tgg ctg gca taatccctac tccactcctg ctatgcttaa 3263

Ile Lys Ala Trp Leu Ala

615 620

gaaattattc atagactcta aataattcga gttgcaggaa ggccggcaaac gagtgaagcc 3323

ccaggagctt acataagtaa gtg act ggg gtg aac gaa tgc agc cgc agc aca 3376

Val Thr Gly Val Asn Glu Cys Ser Arg Ser Thr

1 5 10

tgc aac ttg aag tat gac gag tat agc agg agt ggc agc atg caa tac 3424

特平 1 1 — 0 3 5 7 3 9

Cys Asn Leu Lys Tyr Asp Glu Tyr Ser Arg Ser Gly Ser Met Gln Tyr

15 20 25

aac ccc tta gga aaa acc gac ctt cgc gtt tcc cga ctt tgc ctc ggc 3472

Asn Pro Leu Gly Lys Thr Asp Leu Arg Val Ser Arg Leu Cys Leu Gly

30 35 40

tgt atg acc ttt ggc gag cca gat cgc ggt aat cac gca tgg aca ctg 3520

Cys Met Thr Phe Gly Glu Pro Asp Arg Gly Asn His Ala Trp Thr Leu

45 50 55

ccg gaa gaa agc agc cgt ccc ata att aaa cgt gca ctg gaa ggc ggc 3568

Pro Glu Glu Ser Ser Arg Pro Ile Ile Lys Arg Ala Leu Glu Gly Gly

60 65 70 75

ata aat ttc ttt gat acc gcc aac agt tat tct gac ggc agc agc gaa 3616

Ile Asn Phe Phe Asp Thr Ala Asn Ser Tyr Ser Asp Gly Ser Ser Glu

80 85 90

gag atc gtc ggt cgc gca ctg cgg gat ttc gcc cgt cgt gaa gac gtg 3664

Glu Ile Val Gly Arg Ala Leu Arg Asp Phe Ala Arg Arg Glu Asp Val

95 100 105

gtc gtt gcg acc aaa gtg ttc cat cgc gtt ggt gat tta ccg gaa gga 3712

Val Val Ala Thr Lys Val Phe His Arg Val Gly Asp Leu Pro Glu Gly

110 115 120

Ytta tcc cgt gcg caa att ttg cgc tct atc gac gac agc ctg cga cgt 3760

Leu Ser Arg Ala Gln Ile Leu Arg Ser Ile Asp Asp Ser Leu Arg Arg

125 130 135

ctc ggc atg gat tat gtc gat atc ctg caa att cat cgc tgg gat tac 3808

Leu Gly Met Asp Tyr Val Asp Ile Leu Gln Ile His Arg Trp Asp Tyr

140 145 150 155

aac acg ccg atc gaa gag acg ctg gaa gcc ctc aac gac gtg gta aaa 3856

Asn Thr Pro Ile Glu Glu Thr Leu Glu Ala Leu Asn Asp Val Val Lys

160 165 170

gcc ggg aaa gcg cgt tat atc ggc gcg tca tca atg cac gct tcg cag 3904

Ala Gly Lys Ala Arg Tyr Ile Gly Ala Ser Ser Met His Ala Ser Gln

175 180 185

ttt gct cag gca ctg gaa ctc caa aaa cag cac gac ggc tgg gcg cag ttt 3952

Phe Ala Gln Ala Leu Glu Leu Gln Lys Gln His Gly Trp Ala Gln Phe

190 195 200

gtc agt atg cag gat cac tac aat ctg att tat cgt gaa gaa gag cgc 4000

特平 1 1 - 0 3 5 7 3 9

Val Ser Met Gln Asp His Tyr Asn Leu Ile Tyr Arg Glu Glu Glu Arg

205

210

215

gag atg cta cca ctg tgt tat cag gag ggc gtg gcg gta att cca tgg 4048

Glu Met Leu Pro Leu Cys Tyr Gln Glu Gly Val Ala Val Ile Pro Trp

220

225

230

235

agc ccg ctg gca agg ggc cgt ctg acg cgt ccg tgg gga gaa act acc 4096

Ser Pro Leu Ala Arg Gly Arg Leu Thr Arg Pro Trp Gly Glu Thr Thr

240

245

250

gca cga ctg gtg tct gat gag gtg ggg aaa aat ctc tat aaa gaa agc 4144

Ala Arg Leu Val Ser Asp Glu Val Gly Lys Asn Leu Tyr Lys Glu Ser

255

260

265

gat gaa aat gac gcg cag atc gca gag cgg tta aca ggc gtc agt gaa 4192

Asp Glu Asn Asp Ala Gln Ile Ala Glu Arg Leu Thr Gly Val Ser Glu

270

275

280

gaa ctg ggg gcg aca cga gca caa gtt gcg ctg gcc tgg ttg ttg agt 4240

Glu Leu Gly Ala Thr Arg Ala Gln Val Ala Leu Ala Trp Leu Leu Ser

285

290

295

特平11-035739

aaa ccg ggc att gcc gca ccg att atc gga act tcg cgc gaa gaa cag 4288

Lys Pro Gly Ile Ala Ala Pro Ile Ile Gly Thr Ser Arg Glu Glu Gln

300 305 310 315

ctt gat gag cta ttg aac gcg gtg gat atc act ttg aag ccg gaa cag 4336

Leu Asp Glu Leu Leu Asn Ala Val Asp Ile Thr Leu Lys Pro Glu Gln

320 325 330

att gcc gaa ctg gaa acg ccg tat aaa ccg cat cct gtc gta gga ttt 4384

Ile Ala Glu Leu Glu Thr Pro Tyr Lys Pro His Pro Val Val Gly Phe

335 340 345

aaa taa 4390

Lys

[0264]

<210> 12

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

特平11-035739

<400> 12

ccggatccat ggcggcaatg gttcggtggc aag

33

【0265】

<210> 13

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 13

ccgaattctt attaaatcc tacgacagaga tgcg

34

【0266】

<210> 14

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 14

ccggatccat gagtttgat attgc当地 acc

33

【0267】

<210> 15

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 15

ccgaattctt atgccagcca ggccttgatt ttg

33

【0268】

<210> 16

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 16

ccgaattctt actcattgtc cgggtaaaaa ggg

33

特平11-035739

【0269】

<210> 17

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>*<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 17

ccggatccat ggactttccg cagcaactcg aag 33

【0270】

<210> 18

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 18

ccgaattctt atttattacg ctggatgtcg tag 33

【0271】

<210> 19

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 19

ccggatccta atccctactc cactcctgct atg

33

【0272】

<210> 20

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 20

ggggatcca agcaactcac cattctgggc

30

特平11-035739

【0273】

<210> 21

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 21

gggggatccg cttgcgagac gcatcacctc

30

【0274】

<210> 22

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 22

gggggatcca gtttgatat tgccaaatac cc

32

【0275】

<210> 23

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 23

gggggatcct gccagccagg ccttgattt gg

32

【0276】

<210> 24

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 24

gggggatccg agcaactcac cattctgggc

30

【0277】

<210> 25

特平1 1 - 0 3 5 7 3 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 25

gggggatccg cttgcgagac gcatcacctc

30

【0 2 7 8】

<210> 26

<211> 637

<212> PRT

<213> Rhodobacter sphaeroides

<400> 26

Met Thr Asp Arg Pro Cys Thr Pro Thr Leu Asp Arg Val Thr Leu Pro

1

5

10

15

Val Asp Met Lys Gly Leu Thr Asp Arg Glu Leu Arg Ser Leu Ala Asp

20

25

30

Glu Leu Arg Ala Glu Thr Ile Ser Ala Val Ser Val Thr Gly Gly His

35

40

45

Leu Gly Ala Gly Leu Gly Val Val Glu Leu Thr Val Ala Leu His Ala

50

55

60

Val Phe Asp Ala Pro Arg Asp Lys Ile Ile Trp Asp Val Gly His Gln

65

70

75

80

Cys Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Arg Ile Arg Thr

85

90

95

Leu Arg Gln Gly Gly Leu Ser Gly Phe Thr Lys Arg Ser Glu Ser

100

105

110

Pro Tyr Asp Cys Phe Gly Ala Gly His Ser Ser Thr Ser Ile Ser Ala

115

120

125

Ala Val Gly Phe Ala Ala Ala Arg Glu Met Gly Gly Asp Thr Gly Asp

130

135

140

Ala Val Ala Val Ile Gly Asp Gly Ser Met Ser Ala Gly Met Ala Phe

145

150

155

160

Glu Ala Leu Asn His Gly Gly His Leu Lys Asn Arg Val Ile Val Ile

165

170

175

Leu Asn Asp Asn Glu Met Ser Ile Ala Pro Pro Val Gly Ala Leu Ser

180

185

190

Ser Tyr Leu Ser Arg Leu Tyr Ala Gly Ala Pro Phe Gln Asp Phe Lys

195

200

205

Ala Ala Ala Lys Gly Ala Leu Gly Leu Leu Pro Glu Pro Phe Gln Glu

特平 1 1 - 0 3 5 7 3 9

210

215

220

Gly Ala Arg Arg Ala Lys Glu Met Leu Lys Ser Val Thr Val Gly Gly

225

230

235

240

Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Ser Tyr Val Gly Pro Ile Asp Gly

245

250

255

His Asp Leu Asp Gln Leu Leu Pro Val Leu Arg Thr Val Lys Gln Arg

260

265

270

Ala His Ala Pro Val Leu Ile His Val Ile Thr Lys Lys Gly Arg Gly

275

280

285

Tyr Ala Pro Ala Glu Ala Ala Arg Asp Arg Gly His Ala Thr Asn Lys

290

295

300

Phe Asn Val Leu Thr Gly Ala Gln Val Lys Pro Val Ser Asn Ala Pro

305

310

315

320

Ser Tyr Thr Lys Val Phe Ala Gln Ser Leu Ile Lys Glu Ala Glu Val

325

330

335

Asp Glu Arg Ile Cys Ala Val Thr Ala Ala Met Pro Asp Gly Thr Gly

340

345

350

Leu Asn Leu Phe Gly Glu Arg Phe Pro Lys Arg Thr Phe Asp Val Gly

355

360

365

Ile Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ser Ala Ala Leu Ala Ala Gly

370 375 380

Gly Met Arg Pro Phe Cys Ala Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Gly

385 390 395 400

Tyr Asp Gln Ile Val His Asp Val Ala Ile Gln Arg Leu Pro Val Arg

405 410 415

Phe Ala Ile Asp Arg Ala Gly Leu Val Gly Ala Asp Gly Ala Thr His

420 425 430

Ala Gly Ser Phe Asp Val Ala Phe Leu Ser Asn Leu Pro Gly Ile Val

435 440 445

Val Met Ala Ala Ala Asp Glu Ala Glu Leu Val His Met Val Ala Thr

450 455 460

Ala Ala Ala His Asp Glu Gly Pro Ile Ala Phe Arg Tyr Pro Arg Gly

465 470 475 480

Asp Gly Val Gly Val Glu Met Pro Val Lys Gly Val Pro Leu Gln Ile

485 490 495

Gly Arg Gly Arg Val Val Arg Glu Gly Thr Arg Ile Ala Leu Leu Ser

500 505 510

Phe Gly Thr Arg Leu Ala Glu Val Gln Val Ala Ala Glu Ala Leu Arg

515 520 525

特平 1 1 - 0 3 5 7 3 9

Ala Arg Gly Ile Ser Pro Thr Val Ala Asp Ala Arg Phe Ala Lys Pro

530 535 540

Leu Asp Arg Asp Leu Ile Leu Gln Leu Ala Ala His His Glu Ala Leu

545 550 555 560

Ile Thr Ile Glu Glu Gly Ala Ile Gly Gly Phe Gly Ser His Val Ala

565 570 575

Gln Leu Leu Ala Glu Ala Gly Val Phe Asp Arg Gly Phe Arg Tyr Arg

580 585 590

Ser Met Val Leu Pro Asp Thr Phe Ile Asp His Asn Ser Ala Glu Val

595 600 605

Met Tyr Ala Thr Ala Gly Leu Asn Ala Ala Asp Ile Glu Arg Lys Ala

610 615 620

Leu Glu Thr Leu Gly Val Glu Val Leu Ala Arg Arg Ala

625 630 635

【0 2 7 9】

<210> 27

<211> 1911

<212> DNA

<213> Rhodobacter sphaeroides

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1911)

<400> 27

atg acc gac aga ccc tgc acg ccg acg ctc gac cg_g gtg acg ctc ccg 48
 Met Thr Asp Arg Pro Cys Thr Pro Thr Leu Asp Arg Val Thr Leu Pro
 1 5 10 15

gtg gac atg aag ggc ctc acg gac cgt gag ctg cgc tcg ctg gcc gac 96
 Val Asp Met Lys Gly Leu Thr Asp Arg Glu Leu Arg Ser Leu Ala Asp
 20 25 30

gag ctg cgg gcc gaa acg atc tcg gcc gtg tcg gtg acg ggc ggg cat 144
 Glu Leu Arg Ala Glu Thr Ile Ser Ala Val Ser Val Thr Gly Gly His
 35 40 45

ctg ggc gca ggc ctc ggc gtg gtg gag ttg acg gtt gc_g ctg cat gc_g 192
 Leu Gly Ala Gly Leu Gly Val Val Glu Leu Thr Val Ala Leu His Ala
 50 55 60

gtc ttc gat gc_g ccg cgc gac aag atc atc tgg gac gtg ggc cac cag 240
 Val Phe Asp Ala Pro Arg Asp Lys Ile Ile Trp Asp Val Gly His Gln
 65 70 75 80

tgc tac ccc cac aag atc ctg acc ggg cgg cgc gac cgc atc cgc aca 288
 Cys Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Arg Ile Arg Thr
 85 90 95

特平11-035739

ctg cgg cag ggc ggg ggt ctc tcg ggc ttc acc aag cgc tcc gag agc	336		
Leu Arg Gln Gly Gly Gly Leu Ser Gly Phe Thr Lys Arg Ser Glu Ser			
100	105	110	
ccc tac gac tgt ttc ggc gcg ggc cat tcc tcg acc tcg atc tcg gcc	384		
Pro Tyr Asp Cys Phe Gly Ala Gly His Ser Ser Thr Ser Ile Ser Ala			
115	120	125	
gcg gtg ggc ttt gcc gcg gcg cgc gag atg ggc ggc gac acg ggc gac	432		
Ala Val Gly Phe Ala Ala Ala Arg Glu Met Gly Gly Asp Thr Gly Asp			
130	135	140	
gcg gtg gcg gtg atc ggc gat ggc tcg atg tcg gcc ggc atg gcc ttc	480		
Ala Val Ala Val Ile Gly Asp Gly Ser Met Ser Ala Gly Met Ala Phe			
145	150	155	160
gag gcg ctg aac cac ggc ggg cac ctg aag aac cgg gtg atc gtg atc	528		
Glu Ala Leu Asn His Gly Gly His Leu Lys Asn Arg Val Ile Val Ile			
165	170	175	
ctg aac gac aat gag atg agc atc gcg ccg ccg gtg ggg gcg ctg tcg	576		
Leu Asn Asp Asn Glu Met Ser Ile Ala Pro Pro Val Gly Ala Leu Ser			
180	185	190	
tcc tat ctc tcg cgg ctc tat gcg ggc gcg ccg ttc cag gac ttc aag	624		
Ser Tyr Leu Ser Arg Leu Tyr Ala Gly Ala Pr Phe Gln Asp Phe Lys			
195	200	205	
gcg gcc gcc aag gga gcg ctc ggg ctt ctg ccc gaa ccg ttc cag gag	672		

Ala Ala Ala Lys Gly Ala Leu Gly Leu Leu Pro Glu Pro Phe Gln Glu

210 215 220

ggc gcg cgc cgc gcc aag gag atg ctg aag agc gtc acc gtc ggc ggc 720

Gly Ala Arg Arg Ala Lys Glu Met Leu Lys Ser Val Thr Val Gly Gly

225 230 235 240

acg ctc ttc gag gag ctg ggt ttc tcc tat gtc ggc ccg atc gac ggg 768

Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Ser Tyr Val Gly Pro Ile Asp Gly

245 250 255

cac gat ctc gac cag ctt ctg ccg gtg ctg cgg acc gtc aag cag cgg 816

His Asp Leu Asp Gln Leu Leu Pro Val Leu Arg Thr Val Lys Gln Arg

260 265 270

gcg cat gcg ccg gtg ctg atc cat gtc atc acc aag aag ggc agg ggc 864

Ala His Ala Pro Val Leu Ile His Val Ile Thr Lys Lys Gly Arg Gly

275 280 285

tat gct ccg gcc gag gcc gcg cgc gac cgc ggc cat gcc acg aac aag 912

Tyr Ala Pro Ala Glu Ala Ala Arg Asp Arg Gly His Ala Thr Asn Lys

290 295 300

ttc aac gtc ctg acc ggc gcg cag gtg aag ccg gtc tcg aac gcc ccc 960

Phe Asn Val Leu Thr Gly Ala Gln Val Lys Pro Val Ser Asn Ala Pro

305 310 315 320

tcc tac acc aag gtc ttc gcc cag agc ctc atc aag gag gcc gag gtc 1008

Ser Tyr Thr Lys Val Phe Ala Gln Ser Leu Ile Lys Glu Ala Glu Val

特平 1 1 - 0 3 5 7 3 9

325

330

335

gac gag cgg atc tgc gcg gtg acg gcc gcc atg ccg gac ggg acg ggg 1056
 Asp Glu Arg Ile Cys Ala Val Thr Ala Ala Met Pro Asp Gly Thr Gly

340

345

350

ctc aac ctc ttc ggc gag cgg ttt ccg aag cgc acc ttc gac gtg ggc 1104
 Leu Asn Leu Phe Gly Glu Arg Phe Pro Lys Arg Thr Phe Asp Val Gly

355

360

365

atc gcg gaa cag cat gcg gtg acc ttc tcg gcg gcg ctt gcg gca ggc 1152
 Ile Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ser Ala Ala Leu Ala Ala Gly

370

375

380

ggc atg cgg ccc ttc tgc gcg atc tat tcc acc ttc ctc cag cgc ggc 1200
 Gly Met Arg Pro Phe Cys Ala Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Gly

385

390

395

400

tac gac cag atc gtg cat gac gtg gcg atc cag cgc ctg ccg gtg cgc 1248
 Tyr Asp Gln Ile Val His Asp Val Ala Ile Gln Arg Leu Pro Val Arg

405

410

415

ttc gcc atc gat cgc gcg ggc ctc gtg ggg gcg gac ggc gcc acc cat 1296
 Phe Ala Ile Asp Arg Ala Gly Leu Val Gly Ala Asp Gly Ala Thr His

420

425

430

gcg ggc tcg ttc gac gtg gcc ttc ctg tcg aac ctg ccc ggc atc gtg 1344
 Ala Gly Ser Phe Asp Val Ala Phe Leu Ser Asn Leu Pro Gly Ile Val

435

440

445

gtg atg gcc gcc gac gag gcc gag ctc gtc cat atg gtg gcc acc 1392

Val Met Ala Ala Ala Asp Glu Ala Glu Leu Val His Met Val Ala Thr

450

455

460

gcc gcc gcc cat gac gaa ggg ccc atc gcc ttc cgc tac ccg cgc ggc 1440

Ala Ala Ala His Asp Glu Gly Pro Ile Ala Phe Arg Tyr Pro Arg Gly

465

470

475

480

gac ggc gtg ggg gtc gag atg ccg gtg aag ggc gtg ccg ctc cag atc 1488

Asp Gly Val Gly Val Glu Met Pro Val Lys Gly Val Pro Leu Gln Ile

485

490

495

ggc cgc ggc cgt gtg cgc gag ggc acg cga atc gcg ctt ttg tcc 1536

Gly Arg Gly Arg Val Val Arg Glu Gly Thr Arg Ile Ala Leu Leu Ser

500

505

510

ttc ggc acc cgt ctg gcc gag gtg cag gtg gcc gag ggc ctg cgt 1584

Phe Gly Thr Arg Leu Ala Glu Val Gln Val Ala Ala Glu Ala Leu Arg

515

520

525

gcg cgc ggg atc tct ccc acg gtt gcg gat gcg cgc ttt gca aag ccg 1632

Ala Arg Gly Ile Ser Pro Thr Val Ala Asp Ala Arg Phe Ala Lys Pro

530

535

540

ctc gac cgg gat ctg atc ctg cag ctc gcg gcc cat cac gag ggc ctt 1680

Leu Asp Arg Asp Leu Ile Leu Gln Leu Ala Ala His His Glu Ala Leu

545

550

555

560

特平1 1—0 3 5 7 3 9

atc acc atc gag gag ggc gcc atc ggc ggt ttc ggc agc cat gtg gcg 1728
 Ile Thr Ile Glu Glu Gly Ala Ile Gly Gly Phe Gly Ser His Val Ala
 565 570 575

cag ctt ctg gcc gag gcc ggg gtc ttc gac cgc ggc ttc cgg tat cgc 1776
 Gln Leu Leu Ala Glu Ala Gly Val Phe Asp Arg Gly Phe Arg Tyr Arg
 580 585 590

tcg atg gtg ctg ccc gac acg ttc atc gac cac aac agc gcg gag gtg 1824
 Ser Met Val Leu Pro Asp Thr Phe Ile Asp His Asn Ser Ala Glu Val
 595 600 605

atg tat gcc acc gcc ggg ctg aat gcg gcc gac ata gag cgg aag gcg 1872
 Met Tyr Ala Thr Ala Gly Leu Asn Ala Ala Asp Ile Glu Arg Lys Ala
 610 615 620

ctg gag acg ctg ggg gtg gag gtc ctc gcc cgc cgc gcc 1911
 Leu Glu Thr Leu Gly Val Glu Val Leu Ala Arg Arg Ala
 625 630 635

[0 2 8 0]

<210> 28
 <211> 648
 <212> PRT
 <213> Rhod bacter sphaeroides

<400> 28
 Met Thr Asn Pro Thr Pro Arg Pr Glu Thr Pro Leu Leu Asp Arg Val

特平11-035739

1

5

10

15

Cys Cys Pro Ala Asp Met Lys Ala Leu Ser Asp Ala Glu Leu Glu Arg

20

25

30

Leu Ala Asp Glu Val Arg Ser Glu Val Ile Ser Val Val Ala Glu Thr

35

40

45

Gly Gly His Leu Gly Ser Ser Leu Gly Val Val Glu Leu Thr Val Ala

50

55

60

Leu His Ala Val Phe Asn Thr Pro Thr Asp Lys Leu Val Trp Asp Val

65

70

75

80

Gly His Gln Cys Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Glu Gln

85

90

95

Met Arg Thr Leu Arg Gln Lys Gly Gly Leu Ser Gly Phe Thr Lys Arg

100

105

110

Ser Glu Ser Ala Tyr Asp Pro Phe Gly Ala Ala His Ser Ser Thr Ser

115

120

125

Ile Ser Ala Ala Leu Gly Phe Ala Met Gly Arg Glu Leu Gly Gln Pro

130

135

140

Val Gly Asp Thr Ile Ala Val Ile Gly Asp Gly Ser Ile Thr Ala Gly

145

150

155

160

特平 1 1 - 0 3 5 7 3 9

Met Ala Tyr Glu Ala Leu Asn His Ala Gly His Leu Asn Lys Arg Leu

165 170 175

Phe Val Ile Leu Asn Asp Asn Asp Met Ser Ile Ala Pro Pro Val Gly

180 185 190

Ala Leu Ala Arg Tyr Leu Val Asn Leu Ser Ser Lys Ala Pro Phe Ala

195 200 205

Thr Leu Arg Ala Ala Ala Asp Gly Leu Glu Ala Ser Leu Pro Gly Pro

210 215 220

Leu Arg Asp Gly Ala Arg Arg Ala Arg Gln Leu Val Thr Gly Met Pro

225 230 235 240

Gly Gly Gly Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Thr Tyr Val Gly Pro

245 250 255

Ile Asp Gly His Asp Met Glu Ala Leu Leu Gln Thr Leu Arg Ala Ala

260 265 270

Arg Ala Arg Thr Thr Gly Pro Val Leu Ile His Val Val Thr Lys Lys

275 280 285

Gly Lys Gly Tyr Ala Pro Ala Glu Asn Ala Pro Asp Lys Tyr His Gly

290 295 300

Val Asn Lys Phe Asp Pro Val Thr Gly Glu Gln Lys Lys Ser Val Ala

305 310 315 320

Asn Ala Pr Asn Tyr Thr Lys Val Phe Gly Ser Thr Leu Thr Glu Glu
 325 330 335

Ala Ala Arg Asp Pro Arg Ile Val Ala Ile Thr Ala Ala Met Pro Ser
 340 345 350

Gly Thr Gly Val Asp Ile Met Gln Lys Arg Phe Pro Asn Arg Val Phe
 355 360 365

Asp Val Gly Ile Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu
 370 375 380

Ala Gly Ala Gly Met Lys Pro Phe Cys Ala Ile Tyr Ser Ser Phe Leu
 385 390 395 400

Gln Arg Gly Tyr Asp Gln Ile Ala His Asp Val Ala Leu Gln Asn Leu
 405 410 415

Pro Val Arg Phe Val Ile Asp Arg Ala Gly Leu Val Gly Ala Asp Gly
 420 425 430

Ala Thr His Ala Gly Ala Phe Asp Val Gly Phe Leu Thr Ser Leu Pro
 435 440 445

Asn Met Thr Val Met Ala Ala Ala Asp Glu Ala Glu Leu Ile His Met
 450 455 460

Ile Ala Thr Ala Val Ala Phe Asp Glu Gly Pro Ile Ala Phe Arg Phe

特平 1 1 - 0 3 5 7 3 9

465

470

475

480

Pro Arg Gly Glu Gly Val Gly Val Glu Met Pro Glu Arg Gly Thr Val

485

490

495

Leu Glu Pro Gly Arg Gly Arg Val Val Arg Glu Gly Thr Asp Val Ala

500

505

510

Ile Leu Ser Phe Gly Ala His Leu His Glu Ala Leu Gln Ala Ala Lys

515

520

525

Leu Leu Glu Ala Glu Gly Val Ser Val Thr Val Ala Asp Ala Arg Phe

530

535

540

Ser Arg Pro Leu Asp Thr Gly Leu Ile Asp Gln Leu Val Arg His His

545

550

555

560

Ala Ala Leu Val Thr Val Glu Gln Gly Ala Met Gly Gly Phe Gly Ala

565

570

575

His Val Met His Tyr Leu Ala Asn Ser Gly Gly Phe Asp Gly Gly Leu

580

585

590

Ala Leu Arg Val Met Thr Leu Pro Asp Arg Phe Ile Glu Gln Ala Ser

595

600

605

Pro Glu Asp Met Tyr Ala Asp Ala Gly Leu Arg Ala Glu Asp Ile Ala

610

615

620

特平11-035739

Ala Thr Ala Arg Gly Ala Leu Ala Arg Gly Arg Val Met Pro Leu Arg
625 630 635 640

Gln Thr Ala Lys Pro Arg Ala Val
645

【0281】

<210> 29
<211> 1944
<212> DNA
<213> Rhodobacter sphaeroides

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1944)

<400> 29
atg acc aat ccc acc ccg cga ccc gaa acc ccg ctt ttg gat cgc gtc 48
Met Thr Asn Pro Thr Pro Arg Pro Glu Thr Pro Leu Leu Asp Arg Val
1 5 10 15

tgc tgc ccg gcc gac atg aag gcg ctg agt gac gcc gaa ctg gag cgg 96
Cys Cys Pro Ala Asp Met Lys Ala Leu Ser Asp Ala Glu Leu Glu Arg
20 25 30

ctg gcc gac gaa gtg cgt tcc gag gtg att tcg gtc gtt gcc gag acg 144
Leu Ala Asp Glu Val Arg Ser Glu Val Ile Ser Val Val Ala Glu Thr
35 40 45

特平 1 1 - 0 3 5 7 3 9

gga gga cat ctg ggg tcc tcg ctg ggg gtg gtc gag ctg acc gtc gcg 192
Gly Gly His Leu Gly Ser Ser Leu Gly Val Val Glu Leu Thr Val Ala
50 55 60

ctg cat gca gtc ttc aac acg ccc acc gac aag ctc gtc tgg gac gtg 240
Leu His Ala Val Phe Asn Thr Pro Thr Asp Lys Leu Val Trp Asp Val
65 70 75 80

ggc cac cag tgc tac ccc cac aag atc ctc acc ggc cgg cgc gag cag 288
Gly His Gln Cys Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Glu Gln
85 90 95

atg cgc acc ctg cgc cag aag ggc ggc ctc tcg ggc ttc acc aag cgc 336
Met Arg Thr Leu Arg Gln Lys Gly Gly Leu Ser Gly Phe Thr Lys Arg
100 105 110

tcg gaa tcc gcc tac gac ccg ttc ggc gcg gcc cat tcc tcg acc tcg 384
Ser Glu Ser Ala Tyr Asp Pro Phe Gly Ala Ala His Ser Ser Thr Ser
115 120 125

atc tcg gcc gcg ctc ggc ttt gcc atg ggc cgc gag ctg ggc caa ccc 432
Ile Ser Ala Ala Leu Gly Phe Ala Met Gly Arg Glu Leu Gly Gln Pro
130 135 140

gtg ggc gac acg atc gcc gtg atc ggc gac ggc tcg atc acc gcg ggc 480
Val Gly Asp Thr Ile Ala Val Ile Gly Asp Gly Ser Ile Thr Ala Gly
145 150 155 160

特平11-035739

atg gcc tac gag gcg ctg aac cac ggc cat ctg aac aag cgc ctg	528		
Met Ala Tyr Glu Ala Leu Asn His Ala Gly His Leu Asn Lys Arg Leu			
165	170	175	
ttc gtg atc ctg aac gac aat gac atg agc atc gcg ccg ccc gtg ggg	576		
Phe Val Ile Leu Asn Asp Asp Met Ser Ile Ala Pro Pro Val Gly			
180	185	190	
gct ctg gcg cgc tat ctc gtg aat ctc tcc tcg aag gcg ccc ttc gcc	624		
Ala Leu Ala Arg Tyr Leu Val Asn Leu Ser Ser Lys Ala Pro Phe Ala			
195	200	205	
acg ctg cgc gcg gcc gac ggg ctc gag gcc tcg ctg ccg ggg ccg	672		
Thr Leu Arg Ala Ala Ala Asp Gly Leu Glu Ala Ser Leu Pro Gly Pro			
210	215	220	
ctc cgc gac ggg gcg cgc cgg gcg cgc cag ctc gtg acc ggg atg ccg	720		
Leu Arg Asp Gly Ala Arg Arg Ala Arg Gln Leu Val Thr Gly Met Pro			
225	230	235	240
ggc ggg ggc acg ctc ttc gag gag ctg ggc ttc acc tat gtg ggt ccc	768		
Gly Gly Gly Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Thr Tyr Val Gly Pro			
245	250	255	
atc gac ggc cac gac atg gag gcg ctg ctc cag acg ctg cgc gcg	816		
Ile Asp Gly His Asp Met Glu Ala Leu Leu Gln Thr Leu Arg Ala Ala			
260	265	270	
cgg gcc cgg acc acg ggg ccg gtg ctc atc cat gtg gtc acg aag aag	864		

特平11-035739

Arg Ala Arg Thr Thr Gly Pro Val Leu Ile His Val Val Thr Lys Lys

275

280

285

ggc aag ggc tac gcc cct gcc gag aat gcc ccc gac aag tat cac ggg 912

Gly Lys Gly Tyr Ala Pro Ala Glu Asn Ala Pro Asp Lys Tyr His Gly

290

295

300

gtg aac aag ttc gac ccc gtc acg ggc gag cag aag aag tcg gtc gcc 960

Val Asn Lys Phe Asp Pro Val Thr Gly Glu Gln Lys Lys Ser Val Ala

305

310

315

320

aac gcg ccg aac tac acc aag gtc ttc ggc tcc acc ctg acc gag gag 1008

Asn Ala Pro Asn Tyr Thr Lys Val Phe Gly Ser Thr Leu Thr Glu Glu

325

330

335

gcc gcg cgc gat ccg cgc atc gtg gcc atc acc gcg gcc atg ccc tcg 1056

Ala Ala Arg Asp Pro Arg Ile Val Ala Ile Thr Ala Ala Met Pro Ser

340

345

350

ggc acc ggc gtc gac atc atg cag aag cgt ttc ccg aac cgc gtc ttc 1104

Gly Thr Gly Val Asp Ile Met Gln Lys Arg Phe Pro Asn Arg Val Phe

355

360

365

gac gtg ggc atc gcc gag cag cat gcc gtg acc ttc gcg gcg ggc ctt 1152

Asp Val Gly Ile Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu

370

375

380

gcc ggg gcc ggg atg aag ccc ttc tgc gcg atc tat tcc tcg ttc ctg 1200

Ala Gly Ala Gly Met Lys Pr Phe Cys Ala Ile Tyr Ser Ser Phe Leu

385

390

395

400

caa cgg ggc tac gac cag atc gcc cat gac gtg gcg ctg cag aac ctt 1248

Gln Arg Gly Tyr Asp Gln Ile Ala His Asp Val Ala Leu Gln Asn Leu

405

410

415

ccc gtc cgc ttc gtg atc gac cgg gcg ggg ctc gtg ggg gcc gac ggt 1296

Pro Val Arg Phe Val Ile Asp Arg Ala Gly Leu Val Gly Ala Asp Gly

420

425

430

gcg acc cat gcg ggg gcc ttc gat gtg ggc ttc ctc acg tcg ctg ccc 1344

Ala Thr His Ala Gly Ala Phe Asp Val Gly Phe Leu Thr Ser Leu Pro

435

440

445

aat atg acc gtg atg gcc gcg gcc gac gag gcc gag ctc atc cac atg 1392

Asn Met Thr Val Met Ala Ala Ala Asp Glu Ala Glu Leu Ile His Met

450

455

460

atc gcc acc gcc gtg gcc ttc gac gag ggc ccc att gcc ttc cgc ttc 1440

Ile Ala Thr Ala Val Ala Phe Asp Glu Gly Pro Ile Ala Phe Arg Phe

465

470

475

480

ccg cgg ggc gag ggg gtg ggc gtc gag atg ccc gag cgc ggg acc gtg 1488

Pro Arg Gly Glu Gly Val Gly Val Glu Met Pro Glu Arg Gly Thr Val

485

490

495

ctg gaa ccc ggc cgg ggc cgc gtg gtg cgc gag ggg acg gat gtg gcg 1536

Leu Glu Pro Gly Arg Gly Arg Val Val Arg Glu Gly Thr Asp Val Ala

500

505

510

特平 1 1 — 0 3 5 7 3 9

atc ctt tcc ttc ggc gcg cat ctg cac gag gcc ttg cag gcg gcg aaa			1584
Ile Leu Ser Phe Gly Ala His Leu His Glu Ala Leu Gln Ala Ala Lys			
515	520	525	
ctc ctc gag gcc gag ggg gtg agc gtg acc gtg gcc gac gcc cgc ttc			1632
Leu Leu Glu Ala Glu Gly Val Ser Val Thr Val Ala Asp Ala Arg Phe			
530	535	540	
tcg cgc ccg ctc gac acg ggg ctc att gac cag ctc gtg cgc cat cac			1680
Ser Arg Pro Leu Asp Thr Gly Leu Ile Asp Gln Leu Val Arg His His			
545	550	555	560
gcc gcg ctg gtg acg gtg gag cag ggg gcc atg ggc ggc ttc ggc gct			1728
Ala Ala Leu Val Thr Val Glu Gln Gly Ala Met Gly Gly Phe Gly Ala			
565	570	575	
cat gtc atg cac tat ctc gcc aat tcc ggc ggc ttc gac ggg ggc ctc			1776
His Val Met His Tyr Leu Ala Asn Ser Gly Gly Phe Asp Gly Gly Leu			
580	585	590	
gcg ctc cgg gtc atg acg ctg ccc gac cgc ttc atc gag cag gcg agc			1824
Ala Leu Arg Val Met Thr Leu Pro Asp Arg Phe Ile Glu Gln Ala Ser			
595	600	605	
ccc gag gac atg tat gcc gat gcg ggg ctg cgg gcc gag gat atc gcg			1872
Pro Glu Asp Met Tyr Ala Asp Ala Gly Leu Arg Ala Glu Asp Ile Ala			
610	615	620	

gcc acc gcg cgg ggc gcg ctc gcc cgg ggg cgc gtg atg ccg ctc cgg 1920
 Ala Thr Ala Arg Gly Ala Leu Ala Arg Gly Arg Val Met Pro Leu Arg
 625 630 635 640

cag acg gca aag ccg cgg gcg gtc 1944
 Gln Thr Ala Lys Pro Arg Ala Val
 645

[0282]

<210> 30
 <211> 394
 <212> PRT
 <213> Rhodobacter sphaeroides

<400> 30
 Met Arg Ser Leu Ser Ile Phe Gly Ala Thr Gly Ser Ile Gly Glu Ser
 1 5 10 15

Thr Phe Asp Leu Val Met Arg Lys Gly Gly Pro Glu Ala Phe Arg Thr
 20 25 30

Val Ala Leu Thr Gly Gly Arg Asn Ile Arg Arg Leu Ala Glu Met Ala
 35 40 45

Arg Ala Leu Lys Ala Glu Leu Ala Val Thr Ala His Glu Asp Cys Leu
 50 55 60

Pro Ala Leu Arg Glu Ala Leu Ala Gly Thr Gly Thr Glu Val Ala Gly

特平 1 1 - 0 3 5 7 3 9

65

70

75

80

Gly Ala Gln Ala Ile Ala Glu Ala Ala Asp Arg Pro Ala Asp Trp Thr

85

90

95

Met Ser Ala Ile Val Gly Ala Ala Gly Leu Val Pro Gly Met Arg Ala

100

105

110

Leu Lys His Gly Arg Thr Leu Ala Leu Ala Asn Lys Glu Ser Leu Val

115

120

125

Thr Ala Gly Gln Leu Leu Met Arg Thr Ala Gln Glu Asn Gly Ala Thr

130

135

140

Ile Leu Pro Val Asp Ser Glu His Ser Ala Val Phe Gln Ala Leu Ala

145

150

155

160

Gly Glu Asp Thr Ala Cys Val Glu Arg Val Ile Ile Thr Ala Ser Gly

165

170

175

Gly Pro Phe Arg Asp Trp Ser Leu Glu Arg Ile Arg Ala Cys Thr Val

180

185

190

Ala Glu Ala Gln Ala His Pro Asn Trp Ser Met Gly Gln Arg Ile Ser

195

200

205

Ile Asp Ser Ala Ser Met Phe Asn Lys Ala Leu Glu Leu Ile Glu Thr

210

215

220

特平11-035739

Arg Glu Phe Phe Gly Phe Glu Pro Asp Arg Ile Glu Ala Val Val His
225 230 235 240

Pro Gln Ser Ile Val His Ala Met Val Gly Phe Cys Asp Gly Gly Leu
245 250 255

Met Ala His Leu Gly Pro Ala Asp Met Arg His Ala Ile Gly Phe Ala
260 265 270

Leu Asn Trp Pro Gly Arg Gly Glu Val Pro Val Ala Arg Ile Asp Leu
275 280 285

Ala Gln Ile Ala Ser Leu Thr Phe Gln Lys Pro Asp Glu Glu Arg Phe
290 295 300

Pro Ala Leu Arg Leu Ala Arg Asp Val Met Ala Ala Arg Gly Leu Ser
305 310 315 320

Gly Ala Ala Phe Asn Ala Ala Lys Glu Ile Ala Leu Asp His Phe Ile
325 330 335

Ala Gly Arg Ile Gly Phe Leu Asp Met Ala Ala Val Val Glu Glu Thr
340 345 350

Leu Ala Gly Val Ser Thr Asp Pro Leu Phe Gly Lys Val Pro Asp Ala
355 360 365

Leu Glu Glu Val Leu Ala Met Asp His Leu Ala Arg Arg Ala Ala Glu
370 375 380

特平11-035739

Glu Ala Ala Gly Leu Arg Gln Gln Lys Arg

385 390

【0283】

<210> 31

<211> 1182

<212> DNA

<213> Rhodobacter sphaeroides

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1182)

<400> 31

atg cgc agc ctg tcg atc ttt ggg gcc acc ggc tcc atc ggc gaa tcc 48

Met Arg Ser Leu Ser Ile Phe Gly Ala Thr Gly Ser Ile Gly Glu Ser

1

5

10

15

acc ttc gac ctc gtc atg cgg aag ggc ggg ccc gag gcg ttc cgc acc 96

Thr Phe Asp Leu Val Met Arg Lys Gly Gly Pro Glu Ala Phe Arg Thr

20

25

30

gtc gct ctg acc ggc ggg cgc aac atc cgg cga ctg gcc gaa atg gcg 144

Val Ala Leu Thr Gly Gly Arg Asn Ile Arg Arg Leu Ala Glu Met Ala

35

40

45

cgt gcg ctg aag gcg gag ctt gcc gtc acc gcg cat gag gac tgc ctg 192

Arg Ala Leu Lys Ala Glu Leu Ala Val Thr Ala His Glu Asp Cys Leu

50

55

60

ccc gcg ctg cgc gag gcg ctg gcc ggg acg ggc acc gag gtc gcg ggc 240

Pro Ala Leu Arg Glu Ala Leu Ala Gly Thr Gly Thr Glu Val Ala Gly

65

70

75

80

ggg gcg cag gcc atc gcc gag gcc gac cgg ccg gcc gac tgg acc 288

Gly Ala Gln Ala Ile Ala Glu Ala Ala Asp Arg Pro Ala Asp Trp Thr

85

90

95

atg tcg gcc atc gtg ggc gcc gcg ggc ctc gtg ccc gga atg cgg gcg 336

Met Ser Ala Ile Val Gly Ala Ala Gly Leu Val Pro Gly Met Arg Ala

100

105

110

ctg aag cac ggc cgc acg ctg gcg ctc gcc aac aag gaa agc ctc gtg 384

Leu Lys His Gly Arg Thr Leu Ala Leu Ala Asn Lys Glu Ser Leu Val

115

120

125

acg gca ggg caa ctc ctg atg cgg acg gcc cag gag aac ggc gcc acg 432

Thr Ala Gly Gln Leu Leu Met Arg Thr Ala Gln Glu Asn Gly Ala Thr

130

135

140

atc ctg ccg gtg gac agc gag cac tcc gcg gtc ttt cag gcg ctg gcg 480

Ile Leu Pro Val Asp Ser Glu His Ser Ala Val Phe Gln Ala Leu Ala

145

150

155

160

ggc gag gac acg gcc tgc gtc gag cgc gtc atc atc acg gcg tcc ggc 528

Gly Glu Asp Thr Ala Cys Val Glu Arg Val Ile Ile Thr Ala Ser Gly

特平 1 1 — 0 3 5 7 3 9

165	170	175	
ggg ccg ttc cgc gac tgg agc ctc gag cgc atc cgc gcc tgc acc gtg 576			
Gly Pro Phe Arg Asp Trp Ser Leu Glu Arg Ile Arg Ala Cys Thr Val			
180	185	190	
gcc gag gcg cag gcc cat ccc aac tgg tcc atg ggc cag cgg atc tcc 624			
Ala Glu Ala Gln Ala His Pro Asn Trp Ser Met Gly Gln Arg Ile Ser			
195	200	205	
atc gac agc gcc tcg atg ttc aac aag gcg ctc gag ctg atc gag acg 672			
Ile Asp Ser Ala Ser Met Phe Asn Lys Ala Leu Glu Leu Ile Glu Thr			
210	215	220	
cgc gaa ttc ttc ggc ttc gag ccg gac cgg atc gag gcg gtc gtc cat 720			
Arg Glu Phe Phe Gly Phe Glu Pro Asp Arg Ile Glu Ala Val Val His			
225	230	235	240
ccg caa tcc atc gtc cat gcg atg gtg ggc ttc tgc gac ggg ggc ctg 768			
Pro Gln Ser Ile Val His Ala Met Val Gly Phe Cys Asp Gly Gly Leu			
245	250	255	
atg gcc cat ctc ggc ccc gcc gac atg cgc cac gcc atc gga ttc gcg 816			
Met Ala His Leu Gly Pro Ala Asp Met Arg His Ala Ile Gly Phe Ala			
260	265	270	
ctg aac tgg ccg ggt cgc ggc gag gtg ccc gtc gcc cgg atc gac ctc 864			
Leu Asn Trp Pro Gly Arg Gly Glu Val Pr Val Ala Arg Ile Asp Leu			
275	280	285	

特平11-035739

gca cag att gcg agc ctc acc ttc cag aag cct gac gag gaa cgc ttt	912		
Ala Gln Ile Ala Ser Leu Thr Phe Gln Lys Pro Asp Glu Glu Arg Phe			
290	295	300	
ccg gcc ctg agg ctt gcg cga gac gtc atg gcg gcg cgc ggc ctg tcg	960		
Pro Ala Leu Arg Leu Ala Arg Asp Val Met Ala Ala Arg Gly Leu Ser			
305	310	315	320
ggc gcc gcc ttc aac gcg gcc aag gag atc gcg ctc gat cat ttc atc	1008		
Gly Ala Ala Phe Asn Ala Ala Lys Glu Ile Ala Leu Asp His Phe Ile			
325	330	335	
gcc gga cgc atc ggg ttt ctg gac atg gcg gcg gtg gtc gag gag acg	1056		
Ala Gly Arg Ile Gly Phe Leu Asp Met Ala Ala Val Val Glu Glu Thr			
340	345	350	
ctc gcg ggc gtt tcg acc gac ccc ctg ttc gga aaa gtg ccc gac gcc	1104		
Leu Ala Gly Val Ser Thr Asp Pro Leu Phe Gly Lys Val Pro Asp Ala			
355	360	365	
ctt gag gaa gtg ctg gcc atg gac cat ctc gct cgg aga gcg gca gag	1152		
Leu Glu Glu Val Leu Ala Met Asp His Leu Ala Arg Arg Ala Ala Glu			
370	375	380	
gaa gcc gcc ggt ctc cgc cag cag aaa agg	1182		
Glu Ala Ala Gly Leu Arg Gln Gln Lys Arg			
385	390		

【0284】

<210> 32
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 32
aagctgatct gggacgtggg gca

23

【0285】

<210> 33
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic DNA

<400> 33
tgcttatccgc acaagatcct gac

23

【0286】

<210> 34

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 34

gcatgctgtt ccgcgatgcc gac

23

【図面の簡単な説明】

【図1】 1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸レダクトイソメラーゼの活性に対する反応温度の影響を示した図である。

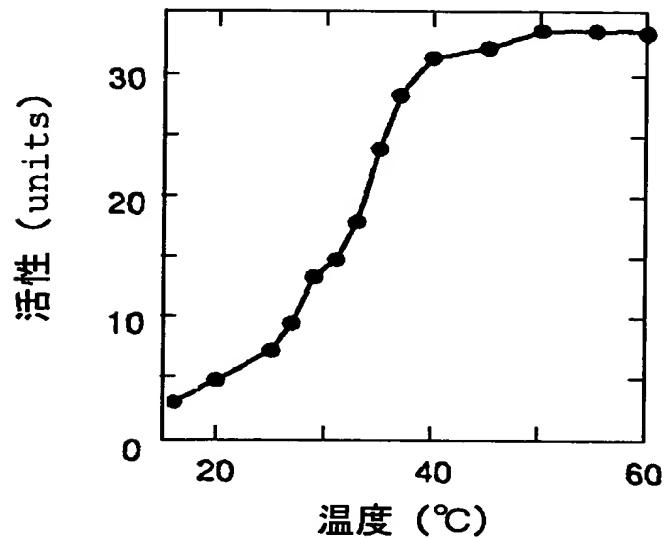
【図2】 1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸レダクトイソメラーゼの活性に対する反応液pHの影響を示した図である。100mMトリス塩酸緩衝液中の各pHにおける活性を示した。pH 8.0での活性を100%として、各pHにおける活性を相対活性として示した。

【図3】 相同組換えを利用した染色体上のyaeM遺伝子破壊方法を示した図である。

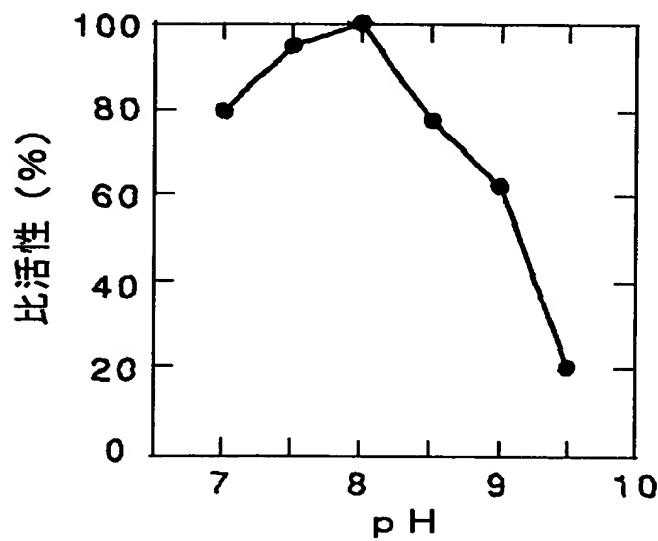
【図4】 1-デオキシ-D-キシリロース5-リン酸レダクトイソメラーゼ活性に及ぼすフォスマミドマイシンの影響を示した図である。

【書類名】 図面

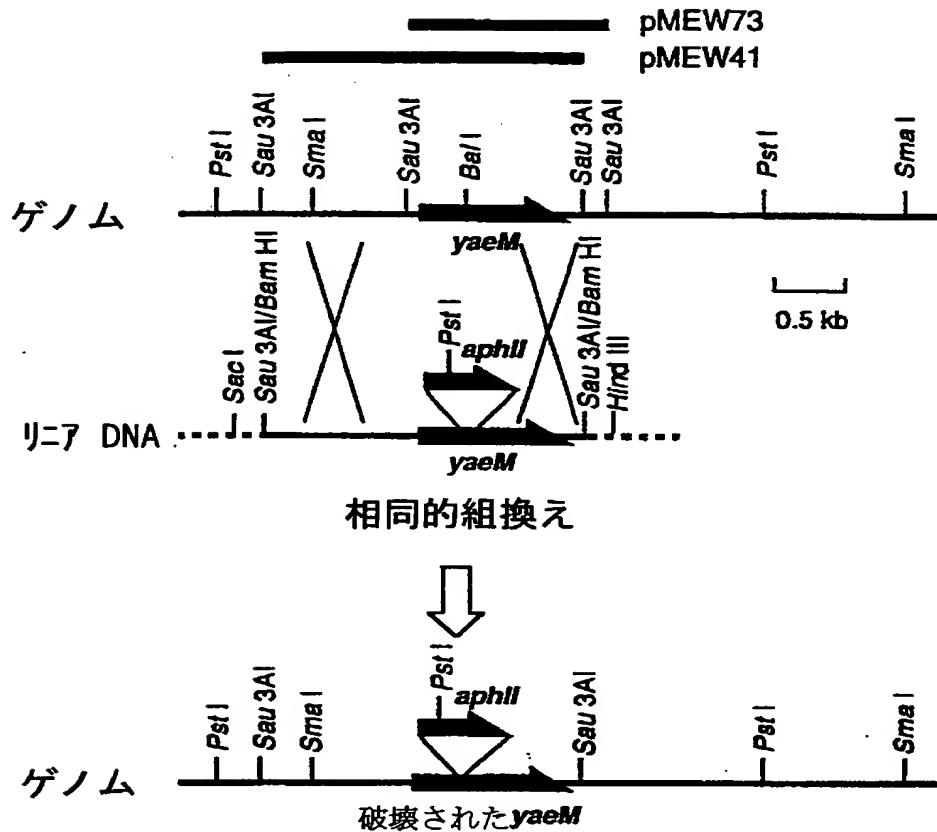
【図 1】



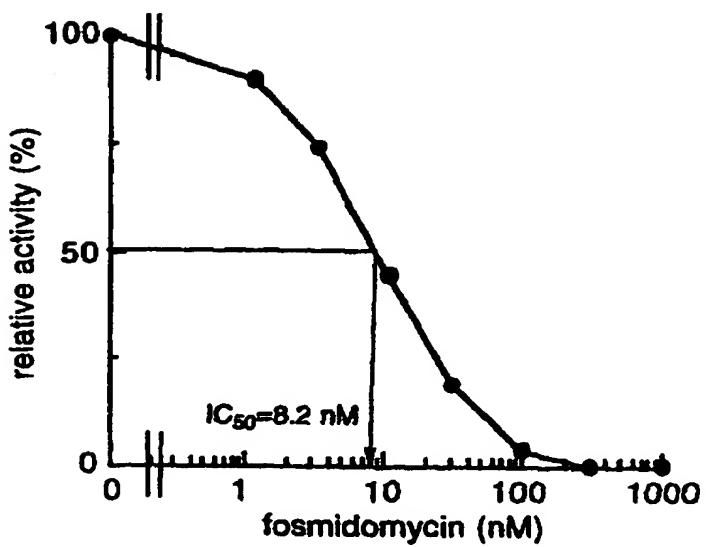
【図 2】



【図3】



【図4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 心疾患、骨粗鬆症、止血、がん予防、免疫賦活等を目的とした医薬品、健康食品および貝類付着防止塗料等に有用なイソプレノイド化合物の製造法、抗菌剤および除草剤を提供する。

【解決手段】 本発明によれば、イソプレノイド化合物の生合成効率を向上させることのできる活性を有する蛋白質をコードするDNAを1つ以上含むDNAを用いた、該DNAのコードする蛋白質あるいはイソプレノイド化合物の製造法、該DNA、該蛋白質、非メバロン酸経路上の酵素反応を阻害する物質を探索することを特徴とする、抗菌および除草活性物質の探索方法、該方法により取得される抗菌物質および除草活性物質を提供することができる。

【選択図】 なし

出願人履歴情報

識別番号 [000001029]

1. 変更年月日 1990年 8月 6日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

氏 名 協和醸酵工業株式会社

